

553, 979

235

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2004 年 11 月 4 日 (04.11.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/094633 A1

- (51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C12N 15/09, C12P 21/02 (74) 代理人: 平木 祐輔, 外(HIRAKI, Yusuke et al.); 〒1050001 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門5森ビル 3階 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2004/005585
- (22) 国際出願日: 2004 年 4 月 19 日 (19.04.2004) (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2003-116280 2003 年 4 月 21 日 (21.04.2003) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人産業技術総合研究所 (NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒1008921 東京都千代田区霞が関一丁目 3 番 1 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 中島 信孝 (NAKASHIMA, Nobutaka) [JP/JP]; 〒0628517 北海道札幌市豊平区月寒東2条17丁目2番1号 独立行政法人産業技術総合研究所 北海道センター内 Hokkaido (JP). 田村 具博 (TAMURA, Tomohiro) [JP/JP]; 〒0628517 北海道札幌市豊平区月寒東2条17丁目2番1号 独立行政法人産業技術総合研究所 北海道センター内 Hokkaido (JP).
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING RECOMBINANT PROTEIN IN BACTERIUM BELONGING TO THE GENUS RHODOCOCOCCUS

(54) 発明の名称: Rhodococcus属細菌における組換えタンパク質を生産する方法

(57) Abstract: It is intended to provide an expression vector capable of constitutionally expressing a foreign gene in a bacterium belonging to the genus *Rhodococcus*. A constitutional expression vector for a bacterium belonging to the genus *Rhodococcus* wherein a DNA consisting of the base sequence of a mutated TipA gene promoter, which is a promoter having a mutation transferred into the -10 region sequence of a TipA gene promoter and can thiostrepton-independently and constitutionally express a gene located downstream thereof, and a promoter sequence for constitutionally expressing a foreign gene are each a base sequence of DNA as claimed in any of claims 1 to 3, and a ribosomal binding site sequence is located in the downstream and a multicloning site sequence allowing the transfer of a foreign gene is located in the still downstream.

(57) 要約: Rhodococcus属細菌中で外来遺伝子を構成的に発現し得る発現ベクターの提供。 TipA遺伝子プロモーターの-10領域配列に変異を導入したプロモーターであって、チオストレプトン非依存的に構成的に下流に存在する遺伝子を発現し得る変異TipA遺伝子プロモーターの有する塩基配列からなるDNAおよび外来遺伝子を構成的に発現するためのプロモーター配列が請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載のDNAの有する塩基配列であって、その下流にリボソーム結合部位配列、更にその下流に、外来遺伝子を導入可能なマルチクローニング部位配列を含む、Rhodococcus属細菌用構成型発現ベクター。

WO 2004/094633 A1

## 明 細 書

*Rhodococcus* 属細菌における組換えタンパク質を生産する方法

## 技術分野

本発明は、*Rhodococcus* 属細菌中で外来遺伝子を発現し得る発現ベクターに関する。

また、本発明は、宿主細胞中で組換えタンパク質を発現することができる誘導型発現ベクターおよび構成型発現ベクター、および該ベクターを用いて組換えタンパク質を発現させる方法に関する。さらに、本発明は *Rhodococcus* 属細胞内で異なるベクター上にコードされる複数の遺伝子を同時に共発現する方法に関する。

## 背景技術

現在、真核生物由来のタンパク質を組換え体として大量調製するためには大腸菌を宿主とした発現システムが広く用いられている。これは該システムが扱いが容易でかつ最も研究が進んでいるからである (Weickert et al., Curr. Opin. Biotechnol. 7: 494-499 [1996])。

一方、本発明者は以前に *Rhodococcus erythropolis* も組換えタンパク質生産の宿主として用いることができることを示した (特開 2004-73032、特願 2002-235008)。*R. erythropolis* は 4℃ から 35℃ まで増殖可能な放線菌の一種で、この菌を宿主とした発現システムの最大の特徴は 4℃ など 10℃ 以下での組換えタンパク質生産が可能な点である。他の大腸菌やバチルス属細菌、酵母菌、Sf9 昆虫細胞 (Cereghino and Cregg, Curr. Opin. Biotechnol. 10 422-427 [1999]、Miller, Curr. Opin. Genet. Dev. 3 97-101 [1993]) を用いたシステムでは、10℃ 以下での組換えタンパク質生産は極めて困難である。10℃ 以下で組換えタンパク質を生産させることで、それまでは生産困難だったタンパク質、例えば宿主細胞の増殖を阻害するものや 30℃ 前後では不溶化するもの、低温に適応した生物由来のタンパク質、などを生産することが可能になった。

本発明者等は、pTip ベクターと呼ばれる一群の *Rhodococcus* 属細菌用発現ベク

ターを構築し、組換えタンパク質生産に用いていた（特開 2004-73032、特願 2002-235008）。これらベクターは、抗生物質チオストレプトンでその発現が誘導される *TipA* 遺伝子のプロモーターを含み、その下流に外来遺伝子（発現させるべき遺伝子）をクローン化するためのマルチクローニング部位（MCS）を含む。従って pTip ベクターは、チオストレプトン誘導型発現ベクターであり、これら発現ベクターで形質転換された *Rhodococcus* 属細菌においては、チオストレプトンが培養液中に添加されたときにのみ、外来タンパク質の生産が誘導される。

#### 非特許文献 1

Weickert et al., Curr. Opin. Biotechnol. 7: 494-499 [1996]

#### 非特許文献 2

Cereghino and Cregg, Curr. Opin. Biotechnol. 10 422-427 [1999]

#### 非特許文献 3

Miller, Curr. Opin. Genet. Dev. 3 97-101 [1993]

### 発明の開示

上記のように本発明者らは、pTip ベクターと呼ばれる一群の *Rhodococcus* 属細菌用誘導型発現ベクターを構築し、組換えタンパク質生産に用いていたが、未だ 2 点開発すべき点が残されていた。

第 1 に、前記 pTip ベクターはすべて、*Rhodococcus* 属細菌内で自律複製するために必要な DNA 領域（複製起点等）が一つの内在性プラスミドに由来していたために、別々の外来遺伝子を含む複数の発現ベクターを同時に、安定に、*Rhodococcus* 属細菌内に共存させることは困難であった。これは同一の自律複製起点を持つ異種プラスミドが細菌内で共存できない、プラスミド不和合性（plasmid incompatibility）と呼ばれる現象によるもので、多くの細菌でこの現象が報告されている（Novick, Microbiol. Rev. 51 381-395 [1987]）。異種プラスミドを単一の細菌の菌体内で共存させることが出来れば、複数の組換えタンパク質を同時に生産することが出来る。例えば、20S プロテアソームと呼ばれるタンパク質複合体は  $\alpha$  サブユニットと  $\beta$  サブユニットの 2 つのポリペプチドから構成されており、機能的な 20S プロテアソーム複合体を組換え体として生産する場合には、こ

れら 2 つのポリペプチドを共発現させなければならない。2 つのポリペプチドを単一細胞内で共発現させる際には、1 つの発現ベクターに複数の外来遺伝子を導入することによって、達成することも出来るが、ベクターのサイズが大きくなったり、制限酵素部位の都合上クローニング過程が複雑になったり、不便であることが多い。現在まで *Rhodococcus* 属細菌において、複数の発現ベクターを用いた組換えタンパク質の共発現系は W002/055709 に記載されたものが存在した。

第 2 に、*Rhodococcus* 属細菌の研究のためには、誘導型発現ベクターのみならず、構成型発現ベクターも重要なツールであるが、構成型発現ベクターが未開発であったことである。なお、既知の *Rhodococcus* 属細菌における構成型発現ベクターとしては、変異型ニトリルヒドラーゼ遺伝子プロモーターを用いたものや（特開平 9-28382、特開平 10-248578）、*rrn* プロモーターを用いたものが知られている（Matsui et al., Curr. Microbiol. 45 240-244 [2002]）。

*Rhodococcus* 属細菌の中には、PCB (polychlorinated biphenyl) や農薬等、様々な難分解性化合物を分解する菌株が多数知られており（バイオレメディエーション）（Bell et al., J. Appl. Microbiol. 85 195-210 [1998]）、また、ある菌株はアクリルアミド等有用な化合物を菌体内に蓄積させる事も知られていて、すでに工業生産に利用されている（バイオプロセス、バイオリアクター）（Yamada et al., Biosci. Biotech. Biochem. 60 1391-1400 [1996]）。従って、上述した 2 点の改良点が克服されれば、組換えタンパク質生産時のみならず、バイオレメディエーション、バイオプロセスの研究時においても *Rhodococcus* 属細菌用発現ベクターの利用性が増すと考えられる。

まず、プラスミド不和合性の問題を解決するためには、本発明者らが先に構築した pTip ベクターに用いていた *Rhodococcus* 属細菌内で自律複製するために必要な DNA 領域とは配列が違う同等の配列を新たに分離し、利用する必要がある。前記 pTip ベクターでは全て *R. erythropolis* JCM2895 株から分離した内在性プラスミド pRE2895（5.4 キロベースペア；以下 kb と略）のうち、自律複製に必要最小限な *RepAB* 遺伝子を含む領域（1.9 kb）を用いていた。従って、他の *R. erythropolis* 株から DNA 配列の異なる内在性プラスミドを分離し、新規発現ベクターを構築することとした。また、*Rhodococcus* 属細菌の形質転換体選択マーカ



一として、前記 pTip ベクターにおいてはテトラサイクリン耐性遺伝子のみ開発していたが、複数のプラスミドで形質転換するためには、別の抗生物質に対する耐性遺伝子を開発する必要がある。本発明者は、*R. erythropolis* DSM 313 株がクロラムフェニコールに対して耐性であることを見出し、耐性を付与している遺伝子を分離し、利用することとした。

さらに、構成型発現ベクター開発のため、*TipA* 遺伝子プロモーターに変異を導入し、構成的に、即ち、チオストレプトン非依存的に、外来遺伝子を発現せしめる変異体を作製することとした。

このようにして、pRE2895 が有する自律複製に必要な領域および誘導型の *TipA* 遺伝子プロモーターを有する前記 pTip ベクターの他に、新たに異なる自律複製するために必要な DNA 領域を有するベクターであって、*TipA* 遺伝子プロモーターを有しており誘導発現が可能なベクター、前記 pTip ベクターとは異なる自律複製するために必要な DNA 領域を有するベクターであって、*TipA* 遺伝子プロモーターに変異を導入したプロモーターを有しており構成的に発現が可能なベクター、および前記 pTip ベクターと同じ自律複製するために必要な DNA 領域および *TipA* 遺伝子プロモーターに変異を導入したプロモーターを有しており構成的に発現が可能なベクターを構築した。これらのベクターのうち自律複製するために必要な DNA 領域が異なる 2 種類のベクターであって、それぞれ異なる外来タンパク質をコードする遺伝子を含むベクターで一つの宿主を共形質転換することが可能であり、該共形質転換した宿主で該異なる外来タンパク質を同時に共発現させることが可能である。

すなわち、本発明は以下の通りである。

- [1] *TipA* 遺伝子プロモーターの -10 領域配列に変異を導入したプロモーターであって、チオストレプトン非依存的に構成的に下流に存在する遺伝子を発現し得る変異 *TipA* 遺伝子プロモーターの有する塩基配列からなる DNA、
- [2] -10 領域配列の変異が、CAGCGT 配列の TATAAT 配列への変異である [1] の DNA、
- [3] 配列番号 107 で表される塩基配列を有する、[2] の DNA、
- [4] 外来遺伝子を構成的に発現するためのプロモーター配列が [1] から [3] の

いずれかの DNA の有する塩基配列であって、その下流にリボソーム結合部位配列、更にその下流に、外来遺伝子を導入可能なマルチクローニング部位配列を含む、*Rhodococcus* 属細菌用構成型発現ベクター、

[5] 配列番号 101 に表される塩基配列を有する pNit-RT1、配列番号 102 に表される塩基配列を有する pNit-RT2、配列番号 105 に表される塩基配列を有する pNit-RC1、配列番号 106 に表される塩基配列を有する pNit-RC2、配列番号 99 に表される塩基配列を有する pNit-QT1、配列番号 100 に表される塩基配列を有する pNit-QT2、配列番号 103 に表される塩基配列を有する pNit-QC1、配列番号 104 に表される塩基配列を有する pNit-QC2、からなる群から選択される [4] の *Rhodococcus* 属細菌用構成型発現ベクター、

[6] *Rhodococcus* 属細菌が *R. erythropolis*、*R. fascians* および *R. opacus* からなる群から選択される、[4] または [5] の発現ベクター、

[7] さらに大腸菌用プラスミドの自律複製に必要な DNA 領域を含み、大腸菌中で複製可能な [4] から [6] のいずれかの発現ベクター、

[8] [4] から [7] のいずれかの発現ベクターを含む形質転換体、および

[9] [4] から [7] のいずれかの発現ベクターを用いて 4℃ から 35℃ の温度で組換えタンパク質を生産する方法。

さらに、本発明は以下の通りである。

[10] *Rhodococcus* 属細菌から単離された、ローリングサークル型の複製様式で複製し得る環状プラスミド、

[11] *Rhodococcus* 属細菌から単離された、ローリングサークル型の複製様式に必須な *Rep* 遺伝子、2 本鎖複製起点領域 DSO (double-stranded origin) および 1 本鎖複製起点領域 SSO (single-stranded origin) を有する [10] の環状プラスミド、

[12] ローリングサークル型の複製様式に必須な DNA の塩基配列が配列番号 90 に表される塩基配列の第 3845 位から第 5849 位の塩基配列である、[11] の環状プラスミド、

[13] 配列番号 90 に表される塩基配列を有する DNA または配列番号 90 に表される塩基配列を有する DNA に相補的な配列を有する DNA にストリンジェントな

条件下でハイブリダイズする DNA を有する [1 0] から [1 2] のいずれかのプラスミド、

[1 4] [1 0] から [1 2] のいずれかの環状プラスミドを含む形質転換体、

[1 5] ローリングサークル型の複製様式で複製し得るベクターであって、*Rhodococcus* 属細菌中で外来遺伝子を 4℃ から 35℃ の温度条件下で発現しうる発現ベクター、

[1 6] *Rhodococcus* 属細菌から単離された、ローリングサークル型の複製様式に必須な *Rep* 遺伝子、2 本鎖複製起点領域 DSO (double-stranded origin) および 1 本鎖複製起点領域 SS0 (single-stranded origin) を有する [1 5] の発現ベクター、

[1 7] ローリングサークル型の複製様式に必須な DNA の塩基配列が配列番号 90 に表される塩基配列の第 3845 位から第 5849 位の塩基配列である、[1 6] の発現ベクター、

[1 8] 外来遺伝子を発現誘導するための誘導型プロモーター配列、その下流にリボソーム結合部位配列、更にその下流に、外来遺伝子を導入可能なマルチクロニング部位配列を含む [1 5] から [1 7] のいずれかの発現ベクター、

[1 9] 発現誘導のための誘導型プロモーターが *TipA* 遺伝子プロモーターで、誘導物質がチオストレプトンである、[1 8] の発現ベクター、

[2 0] プロモーターの塩基配列が [1] から [3] のいずれかの DNA の有する塩基配列からなる [4] の発現ベクター、

[2 1] 配列番号 93 に表される塩基配列を有する pTip-RT1、配列番号 94 に表される塩基配列を有する pTip-RT2、配列番号 97 に表される塩基配列を有する pTip-RC1、配列番号 98 に表される塩基配列を有する pTip-RC2 からなる群から選択される [1 5] から [1 9] のいずれかの *Rhodococcus* 属細菌用誘導型発現ベクター、

[2 2] *Rhodococcus* 属細菌中で外来遺伝子を構成的に発現し得る発現ベクターであって、プラスミド pRE2895 由来の *Rhodococcus* 属細菌中でのプラスミドの自律複製に必要な DNA 配列および [1] から [3] のいずれかのプロモーター配列 DNA を含む、*Rhodococcus* 属細菌中で 4℃ から 35℃ の温度条件下で外来遺伝子を構

成的に発現し得る発現ベクター、

[2 3] プラスミド pRE2895 由来の *Rhodococcus* 属細菌中でのプラスミドの自律複製に必要な DNA 配列が *RepA* および *RepB* 遺伝子を含む 1.9kb の領域の DNA 配列である [2 2] の発現ベクター、

[2 4] 構成型プロモーター配列の下流に、さらにリボソーム結合部位配列、更にその下流に、外来遺伝子を導入可能なマルチクローニング部位配列を含む [2 2] または [2 3] の発現ベクター、

[2 5] 配列番号 99 に表される塩基配列を有する pNit-QT1、配列番号 100 に表される塩基配列を有する pNit-QT2、配列番号 103 に表される塩基配列を有する pNit-QC1、配列番号 104 に表される塩基配列を有する pNit-QC2、からなる群から選択される [2 2] から [2 4] のいずれかの *Rhodococcus* 属細菌用構成型発現ベクター、

[2 6] 互いにプラスミド不和合性を起こさない少なくとも 2 種類の *Rhodococcus* 属細菌由来のプラスミドを含む *Rhodococcus* 属細菌であって、少なくとも 2 種類のプラスミドが、プラスミドの自律複製に必要な DNA 配列として、それぞれローリングサークル型複製様式をもつ DNA 配列と、pRE2895 由来のプラスミドの自律複製に必要な DNA 配列を有する、*Rhodococcus* 属細菌、

[2 7] 互いにプラスミド不和合性を起こさない少なくとも 2 種類の *Rhodococcus* 属細菌由来の発現プラスミドベクターであり外来タンパク質をコードする遺伝子を含む発現プラスミドベクターを含む *Rhodococcus* 属細菌であって、少なくとも 2 種類のプラスミドベクターが、プラスミドの自律複製に必要な DNA 配列として、それぞれ *Rhodococcus* 属細菌由来のローリングサークル型複製様式をもつ DNA 配列と、pRE2895 由来のプラスミドの自律複製に必要な DNA 配列を有し、外来タンパク質をコードする遺伝子を 4℃ から 35℃ の温度条件下で共発現し得る *Rhodococcus* 属細菌、

[2 8] 2 種類のプラスミドベクターが外来タンパク質を生産せしめるためのプロモーター配列、その下流にリボソーム結合部位配列、更にその下流に、外来遺伝子を導入可能なマルチクローニング部位配列、をそれぞれ全て含む、[2 7] の *Rhodococcus* 属細菌、

[29] 少なくとも2種類のプラスミドベクターの一方が、[4]、[5]、[15]～[19]、[20]および[21]のいずれかのベクターであり、もう一方が、[22]から[25]のいずれかのベクターもしくは[22]から[25]のベクターにおいて少なくともプロモーターを誘導型プロモーターである *TipA* 遺伝子プロモーターに置換した誘導発現し得るベクターである、[27]または[28]の *Rhodococcus* 属細菌、

[30] 少なくとも2種類のプラスミドベクターの一方が、[4]、[5]、[15]～[19]、[20]および[21]のいずれかのベクターであり、もう一方が、配列番号49に表される塩基配列を有する pTip-NH1、配列番号50に表される塩基配列を有する pTip-NH2、配列番号51に表される塩基配列を有する pTip-CH1、配列番号52に表される塩基配列を有する pTip-CH2、配列番号53に表される塩基配列を有する pTip-LNH1、配列番号54に表される塩基配列を有する pTip-LNH2、配列番号55に表される塩基配列を有する pTip-LCH1、配列番号56に表される塩基配列を有する pTip-LCH2、配列番号91に表される塩基配列を有する pTip-QT1、配列番号92に表される塩基配列を有する pTip-QT2、配列番号95に表される塩基配列を有する pTip-QC1、配列番号96に表される塩基配列を有する pTip-QC2、pTip-CH1.1、pTip-CH2.1、pTip-LCH1.1、pTip-LCH2.1、[22]から[25]のいずれかのベクターまたは[22]から[25]のいずれかのベクターにおいて少なくともプロモーターを誘導型プロモーターである *TipA* 遺伝子プロモーターに置換した誘導発現し得るベクターからなる群から選択されるベクターである、[27]から[29]のいずれかの *Rhodococcus* 属細菌、

[31] ローリングサークル型の複製様式に必要な DNA 配列が配列番号90に表される塩基配列の第3845位から第5849位の DNA であり、pRE2895由来のプラスミドの自律複製に必要な DNA 配列が *RepA* および *RepB* 遺伝子を含む1.9 kbの領域の DNA である[26]から[30]のいずれかの *Rhodococcus* 属細菌、

[32] 互いにプラスミド不和合性を起こさない少なくとも2種類の *Rhodococcus* 属細菌由来の発現プラスミドベクターであり外来タンパク質をコードする遺伝子を含む発現プラスミドベクターを含む *Rhodococcus* 属細菌であって、少なくとも2種類のプラスミドベクターが、プラスミドの自律複製に必要な DNA

配列として、それぞれ *Rhodococcus* 属細菌由来のローリングサークル型複製様式をもつ DNA 配列と、pRE2895 由来のプラスミドの自律複製に必要な DNA 配列を有する少なくとも 2 種類のベクターで *Rhodococcus* 属細菌を形質転換し、培養しそれぞれの発現ベクターが含む外来タンパク質をコードする遺伝子を 4℃ から 35℃ の温度条件下で共発現させて該外来タンパク質を産生させる方法、

[3 3] 2 種類のプラスミドベクターが外来タンパク質を生産せしめるためのプロモーター配列、その下流にリボソーム結合部位配列、更にその下流に、外来遺伝子を導入可能なマルチクロニング部位配列、をそれぞれ全て含む、[3 2]の方法、

[3 4] 少なくとも 2 種類のプラスミドベクターの一方が、[4]、[5]、[1 5]～[1 9]、[2 0]および[2 1]のいずれかのベクターであり、もう一方が、配列番号 4 9 に表される塩基配列を有する pTip-NH1、配列番号 5 0 に表される塩基配列を有する pTip-NH2、配列番号 5 1 に表される塩基配列を有する pTip-CH1、配列番号 5 2 に表される塩基配列を有する pTip-CH2、配列番号 5 3 に表される塩基配列を有する pTip-LNH1、配列番号 5 4 に表される塩基配列を有する pTip-LNH2、配列番号 5 5 に表される塩基配列を有する pTip-LCH1、配列番号 5 6 に表される塩基配列を有する pTip-LCH2、配列番号 9 1 に表される塩基配列を有する pTip-QT1、配列番号 9 2 に表される塩基配列を有する pTip-QT2、配列番号 9 5 に表される塩基配列を有する pTip-QC1、配列番号 9 6 に表される塩基配列を有する pTip-QC2、pTip-CH1.1、pTip-CH2.1、pTip-LCH1.1、pTip-LCH2.1、[2 2]から[2 5]のいずれかのベクターまたは[2 2]から[2 5]のいずれかのベクターにおいて少なくともプロモーターを誘導型プロモーターである *TipA* 遺伝子プロモーターに置換した誘導発現し得るベクターからなる群から選択されるベクターである、[3 2]から[3 4]のいずれかの方法、

[3 5] ローリングサークル型の複製様式に必須な DNA の塩基配列が配列番号 9 0 に表される塩基配列の第 3845 位から第 5849 位の塩基配列であり、pRE2895 由来のプラスミドの自律複製に必要な DNA 配列が *RepA* および *RepB* 遺伝子を含む 1.9 kb の領域の DNA である [3 2]から[3 4]のいずれかの方法。

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明は、*Rhodococcus* 属細菌から単離された、ローリングサークル型の複製様式で複製し得る環状プラスミドおよび該環状プラスミドから構築された発現ベクターを包含する。ローリングサークル型の複製様式とは、二本鎖環状 DNA の複製の様式であり、特異的エンドヌクレアーゼの作用により特定の DNA 鎖上の特定の位置にニックが入り、そのニックの 3'-OH 端から DNA 合成が開始され、ニックの入っていない環状 DNA 鎖を鋳型として一回りする形で進む複製様式をいう。このような複製様式をとるためには、ローリングサークル型の複製様式に必要な DNA 領域が必要であり、例えば *Rep* 遺伝子が挙げられる。さらに、2 本鎖複製起点領域 DS0 (double-stranded origin) および 1 本鎖複製起点領域 SS0 (single-stranded origin) が必要である。従って、本発明のローリングサークル型の複製様式で複製し得る環状プラスミドおよび該環状プラスミドから構築された発現ベクターは、ローリングサークル型の複製様式に必要な DNA 領域、すなわち *Rep* 遺伝子、2 本鎖複製起点領域 DS0 (double-stranded origin) および 1 本鎖複製起点領域 SS0 (single-stranded origin) を含むプラスミドおよび発現ベクターである。このようなプラスミドは、*Rhodococcus* 属細菌から単離することができ例えば、*Rhodococcus erythropolis* DSM8424 株から単離した pRE8424 が挙げられ、その全長配列を配列番号 90 に示す。配列番号 90 中、第 3845 位から 5849 位までがローリングサークル型の複製様式に必要な DNA 領域、すなわち *Rep* 遺伝子の DNA、2 本鎖複製起点領域 DS0 (double-stranded origin) および 1 本鎖複製起点領域 SS0 (single-stranded origin) を表す。

本発明は、配列番号 90 で表されるプラスミドを構成する DNA に相補的な DNA にストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズする DNA から構成されるプラスミドであって、ローリングサークル型の複製様式で複製し得るプラスミドも包含する。ここで、ストリンジेंटな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が 500~1000 mM、好ましくは 700 mM であり、温度が 50~70 °C、好ましくは 65 °C での条件をいう。このようなプラスミドはその全長塩基配列が配列番号 90 で表される塩基配列と BLAST 等（例えば、デフォルトすなわち初期設定のパラメータを用いて）を用いて計算したときに、90%以上、好ましくは 95%以上、さらに好ましくは 98%以上の相同性を有する塩基配列からなるプラスミドである。

該プラスミドから得られたローリングサークル型の複製様式に必要な DNA 領域である *Rep* 遺伝子、2 本鎖複製起点領域 DS0 (double-stranded origin) および 1 本鎖複製起点領域 SS0 (single-stranded origin) を含み、さらにプロモーター配列、その下流にリボソーム結合部位配列、更にその下流に、外来遺伝子を導入可能なマルチクロニング部位配列を含む発現ベクターも本発明に包含される。さらに、外来遺伝子および転写終結配列を含んでいてもよく、プロモーター活性を有する DNA 配列、外来遺伝子および転写終結配列は発現カセット (Expression cassette) を構成する。ここで、プロモーター配列は薬剤等の誘導因子によりその下流に導入した外来遺伝子を誘導的に発現し得るプロモーターも、誘導因子に依存することなく構成的に外来遺伝子を発現し得るプロモーターも含まれる。前者の誘導的に外来遺伝子を発現し得るプロモーターとして、例えば *TipA* 遺伝子プロモーターが挙げられ、チオストレプトンの存在下でその下流の外来遺伝子を誘導的に発現する。さらに、本発明のベクターは、*TipA* タンパク質をコードする *TipA* 遺伝子、*TipA* 遺伝子の発現を誘導する *ThcA* 遺伝子プロモーター等の適当なプロモーターを含んでいてもよい。*TipA* 遺伝子および *TipA* 遺伝子発現用プロモーターは誘導カセット (Inducer cassette) を構成する。宿主細胞が *Rhodococcus* 属に属する細菌である場合、該細菌はチオストレプトンに対して感受性であるため、チオストレプトンに対しての耐性を付与するチオストレプトン耐性遺伝子等を組込む。さらに、*TipA* 遺伝子プロモーターは *TipA-LG10* プロモーター等のその配列を改変させたものでもよい。*TipA* 遺伝子プロモーターの配列は図 1 2 に示される。

また、後者の構成的に外来遺伝子を発現し得るプロモーターとして、前記 *TipA* 遺伝子プロモーターを改変したプロモーターが挙げられる。このような改変 *TipA* 遺伝子プロモーターとしては、*TipA* 遺伝子プロモーターの -10 領域配列に変異を導入したプロモーターが挙げられ、具体的には、-10 領域配列の変異が、CAGCGT 配列の TATAAT 配列への変異であるプロモーターが挙げられる。さらに、このようなプロモーターの一例として、図 1 9 に示す配列に含まれるプロモーターが例示できる。

また、図 1 2 に示すプロモーターの配列を有する DNA または図 1 9 に示す配列に含まれるプロモーターの配列を有する DNA に相補的な DNA にストリンジェント



な条件下でハイブリダイズする DNA からなり、それぞれのプロモーター活性と同等の活性を有するポリヌクレオチドもプロモーターとして用いることができる。ここで、ストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が 500～1000 mM、好ましくは 700 mM であり、温度が 50～70 °C、好ましくは 65 °C での条件をいう。このようポリヌクレオチドはその全長塩基配列が上記プロモーターの塩基配列と BLAST 等（例えば、デフォルトすなわち初期設定のパラメータを用いて）を用いて計算したときに、90%以上、好ましくは 95%以上、さらに好ましくは 98%以上の相同性を有する塩基配列からなるプロモーターである。

本発明は、さらに前記ベクターにさらに大腸菌用プラスミドの自律複製に必要な DNA 領域ならびに大腸菌の形質転換体選択マーカーを含むベクターも含まれ、このようなベクターは *Rhodococcus* 属細菌と大腸菌とのシャトルベクターとして利用できる。この際、大腸菌では構成型発現ベクターとして利用することができる。大腸菌用プラスミドの自律複製に必要な DNA 領域としては *ColE1*、*ColE2* 配列等、大腸菌の形質転換体選択マーカーとしてはアンピシリン耐性遺伝子などの公知のものを使用することができ、これらは公知の大腸菌用クローニングベクターから得ることができる。

*TipA* 遺伝子プロモーター、ローリングサークル型の複製様式に必要な DNA 領域、2 本鎖複製起点領域 DS0 (double-stranded origin) および 1 本鎖複製起点領域 SS0 (single-stranded origin) を含み、さらに前記プロモーター配列の下流にリボソーム結合部位配列、更にその下流に、外来遺伝子を導入可能なマルチクローニング部位配列および大腸菌用プラスミドの自律複製に必要な DNA 領域を含む *Rhodococcus* 用発現ベクターとして、配列番号 93 に表される塩基配列を有する pTip-RT1、配列番号 94 に表される塩基配列を有する pTip-RT2、配列番号 97 に表される塩基配列を有する pTip-RC1、配列番号 98 に表される塩基配列を有する pTip-RC2 が例示できる。また、*TipA* 遺伝子プロモーターの代わりに *TipA* 遺伝子プロモーターの -10 領域配列の変異が CAGCGT 配列の TATAAT 配列への変異であるプロモーターを有するベクターとしては、配列番号 101 に表される塩基配列を有する pNit-RT1、配列番号 102 に表される塩基配列を有する pNit-RT2、配列番号 105 に表される塩基配列を有する pNit-RC1、配列番号 106 に表される塩

塩基配列を有する pNit-RC2 が例示できる。これらの、配列番号で表される塩基配列からなる構成する DNA に相補的な DNA にストリンジントな条件下でハイブリダイズする DNA から構成されるベクターであって、外来遺伝子を宿主微生物中で発現し得るベクターも本発明に包含される。ここで、ストリンジントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が 500~1000 mM、好ましくは 700 mM であり、温度が 50~70 °C、好ましくは 65 °C での条件をいう。このようなベクターはその全長塩基配列が上記ベクターの配列番号で表される塩基配列と BLAST 等（例えば、デフォルトすなわち初期設定のパラメータを用いて）を用いて計算したときに、90%以上、好ましくは 95%以上、さらに好ましくは 98%以上の相同性を有する塩基配列からなるベクターである。配列番号で示される以下のベクターについても同様である。

本発明は、さらに上記のローリングサークル型の複製様式に必要な DNA 領域（*Rep* 遺伝子、DSO および SS0）ではなく、他の自律複製に必要な DNA 領域を含む発現ベクターをも包含する。このように複製に必要な DNA 領域が異なる発現ベクター同士は、一つの宿主に同時に導入し、安定に保持することができる。他の自律複製に必要な DNA 領域として例えば、*RepA* 遺伝子および *RepB* 遺伝子が挙げられる。*RepA* 遺伝子および *RepB* 遺伝子を含む DNA 領域は、*Rhodococcus* 属細菌、例えば *R. erythropolis* JCM2895 株から分離した内在性プラスミド pRE2895 から単離することができる。*RepA* 遺伝子および *RepB* 遺伝子を含む 1.9 kb の領域は、配列番号 49 の第 6233 位から第 8166 位であり、このうち *RepA* ORF は 6765 位から 7652 位、*RepB* ORF は 7652 から 7936 位である。また、*RepA* 遺伝子および *RepB* 遺伝子を含む DNA 領域は後述の参考例に記載のベクター pHN129 の制限地図（図 1）を参照すれば得ることができる。また、配列番号 49 の第 6233 位から第 8166 位で表される塩基配列からなる DNA に相補的な DNA にストリンジントな条件下でハイブリダイズする DNA であって、ベクターに自律複製能を付与する DNA も本発明の *RepA* 遺伝子および *RepB* 遺伝子を含む 1.9 kb の領域として用いることができる。ここで、ストリンジントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が 500~1000 mM、好ましくは 700 mM であり、温度が 50~70 °C、好ましくは 65 °C での条件をいう。このような DNA はその全長塩基配列が配列番号 49 の第 6233 位から第 8166

位で表される塩基配列と BLAST 等（例えば、デフォルトすなわち初期設定のパラメータを用いて）を用いて計算したときに、90%以上、好ましくは 95%以上、さらに好ましくは 98%以上の相同性を有する塩基配列からなる DNA である。この自律複製に必要な DNA 領域および *TipA* 遺伝子プロモーターの -10 領域配列が CAGCGT 配列の TATAAT 配列へ変異したプロモーター、さらにその下流にリボソーム結合部位配列、更にその下流に、外来遺伝子を導入可能なマルチクローニング部位配列を含む発現ベクターを含む発現ベクターはマルチクローニング部位に組込まれた外来遺伝子を誘導因子に依存することなく構成的に発現することができる。このような発現ベクターとして、配列番号 99 に表される塩基配列を有する pNit-QT1、配列番号 100 に表される塩基配列を有する pNit-QT2、配列番号 103 に表される塩基配列を有する pNit-QC1、配列番号 104 に表される塩基配列を有する pNit-QC2、からなる群から選択される *Rhodococcus* 属細菌用構成型発現ベクターが挙げられ、さらにチオストレプトンの存在下で、導入された外来遺伝子を誘導的に発現し得る配列番号 49 に表される塩基配列を有する pTip-NH1、配列番号 50 に表される塩基配列を有する pTip-NH2、配列番号 51 に表される塩基配列を有する pTip-CH1、配列番号 52 に表される塩基配列を有する pTip-CH2、配列番号 53 に表される塩基配列を有する pTip-LNH1、配列番号 54 に表される塩基配列を有する pTip-LNH2、配列番号 55 に表される塩基配列を有する pTip-LCH1、配列番号 56 に表される塩基配列を有する pTip-LCH2、pTip-CH1.1、pTip-CH2.1、pTip-LCH1.1 および pTip-LCH2.1 の誘導性プロモーターを前記の *TipA* 遺伝子プロモーターの -10 領域配列の変異が CAGCGT 配列の TATAAT 配列への変異であるプロモーターに置換したベクターが挙げられる。なお、誘導型発現ベクターは *TipA* 遺伝子もしくはその変異体および *TipA* 遺伝子発現用プロモーターを含む誘導力セットならびにチオストレプトン耐性遺伝子も含んでいる必要がある。

本発明の上記発現ベクターに外来遺伝子を組み込み、宿主微生物に導入し該宿主微生物を培養することにより、該外来遺伝子を発現させることができる。発現ベクターへの外来遺伝子の組込みは公知の遺伝子工学的手法により行うことができる、宿主微生物への発現ベクターの導入も公知の手法で行うことができる。さらに、宿主微生物の培養も、それぞれの微生物に適合した培地を用いて適当な条件

下で培養を行えばよい。ベクターを組み込む宿主生物としては、*Rhodococcus* 属細菌および大腸菌が挙げられる。ここで、外来遺伝子とは、本発明のベクターを用いて発現させようとする標的タンパク質をコードする遺伝子であり、宿主細胞以外の生物由来のタンパク質をコードする遺伝子をいう。本発明のベクターを用いて発現産生させるタンパク質は限定されず、いかなるタンパク質も対象となり得る。本発明の発現ベクターを導入する宿主生物が低温で増殖可能な微生物、例えば *R. erythropolis*、*R. fascians* および *R. opacus* 等の *Rhodococcus* 属細菌である場合、通常の微生物の増殖に適した温度条件、即ち約 15 °C を超える中高温で発現させることが困難であるかまたは不可能なタンパク質を発現産生させることができる。このようなタンパク質として、宿主細胞の至適生育温度範囲内の温度で発現できないが同一のまたは異なる種類の宿主細胞を用いた場合にその微生物の好適生育温度範囲内の温度よりも低温で発現できるタンパク質、宿主微生物の好適生育温度範囲内の温度で発現させた場合に該宿主細胞にとって致死性となるが同一のまたは異なる種類の宿主細胞の好適生育温度範囲内の温度よりも低温ではそれらの宿主細胞に致死性でないタンパク質、宿主細胞の好適生育温度範囲内の温度で発現させた場合に該宿主細胞の増殖を阻害するが同一のまたは異なる種類の宿主細胞の好適生育温度範囲内の温度よりも低温ではそれらの宿主細胞の増殖を阻害しないタンパク質、宿主細胞の好適生育温度範囲内の温度で発現させた場合に封入体と呼ばれる不活性なタンパク質の凝集を作るが同一のまたは異なる種類の宿主細胞の好適生育温度範囲内の温度よりも低温でそれらの宿主細胞で発現させた場合に活性のある可溶性タンパク質となるタンパク質、好適生育温度範囲が 20 °C 以下である好冷菌、低温環境下に生存する変温動物、低温環境下に生存する植物由来のタンパク質が挙げられる。

発現ベクターが含んでいるプロモーターが誘導型のプロモーターの場合、誘導物質の宿主微生物の培養系に添加することにより、外来遺伝子の発現産生を誘導することができる。本発明の発現ベクターが含む誘導型プロモーターとして、*TipA* 遺伝子プロモーターが挙げられ、該遺伝子プロモーターを含んでいる場合、チオストレプトンの添加により発現産生が誘導される。この際チオストレプトンは、終濃度 0.1  $\mu\text{g/ml}$  以上、好ましくは 1  $\mu\text{g/ml}$  以上となるように添加すればよい。

ただし、10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  を越えると生育が悪くなる。また、本発明の発現ベクターが構成型のプロモーターを含んでいる場合は、誘導物質を添加することなく外来遺伝子が発現産生される。

本発明の発現ベクターのうち、自律複製に必要な DNA が互いに異なる発現ベクターは同一の微生物細胞に同時に共形質転換することにより、該細胞内で安定に維持され、それぞれのベクターが含んでいる外来遺伝子を同時に発現産生させることができる。この場合、それぞれのベクターが含んでいる外来遺伝子は同じタンパク質をコードするものでも、異なるタンパク質をコードするものでもよい。例えば、2つのサブユニットからなるタンパク質のそれぞれのサブユニットを自律複製に必要な DNA が互いに異なる別々の発現ベクターに組込んで、同一の微生物細胞に導入することにより、一つの細胞内で各サブユニットが同時に発現され、サブユニット同士が会合して完全なタンパク質が産生される。この際、発現ベクターは構成的に外来遺伝子を発現し得るもの、誘導的に発現し得るものの何れの組合わせを用いてもよいが、自律複製に必要な DNA が異なる複数の発現ベクターのすべてを誘導的に外来遺伝子を発現し得るものにし、発現誘導物質で発現誘導することにより、2種類以上の外来タンパク質を同時に発現産生させることができる。

さらに、本発明の発現ベクター中の大腸菌用複製起点について異なるものを選択することにより、大腸菌においても2種類のタンパク質を同時発現させることができる。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願 2003-116280 号の明細書および/または図面に記載される内容を包含する。

#### 図面の簡単な説明

図1は、誘導型発現ベクターのバックボーンになるプラスミド pHN136 の構築図である。図中に制限酵素認識部位と構造遺伝子の位置をしめす。数字は塩基対（キロベースペア：kb）を示す。

図2は、チオストレプトン耐性遺伝子を持つプラスミド pHN143 の構築図である。図中に制限酵素認識部位と構造遺伝子の位置をしめす。数字は塩基対（キロベ

スペアー：kb)を示す。CIAPはCalf Intestine Alkaline Phosphataseを、Blu.は平滑末端(Blunt end)を意味する。

図3は、Inducer cassetteを持つプラスミド pHN62の構築図である。図中に制限酵素認識部位と構造遺伝子の位置をしめす。数字は塩基対(キロベースペア：kb)を示す。Blu.は平滑末端(Blunt end)を意味する。

図4は、Expression cassetteを持つプラスミド pHN153の構築図である。図中に制限酵素認識部位と構造遺伝子の位置をしめす。数字は塩基対(キロベースペア：kb)を示す。CIAPは(Calf Intestine Alkaline PhosphataseをBlu.は平滑末端(Blunt end)を意味する。

図5は、テトラサイクリン耐性遺伝子を持つプラスミド pHN169の構築図である。図中に制限酵素認識部位と構造遺伝子の位置をしめす。数字は塩基対(キロベースペア：kb)を示す。CIAPはCalf Intestine Alkaline Phosphataseを、Blu.は平滑末端(Blunt end)を意味する。

図6は、PIPをレポーター遺伝子として持つ誘導型発現ベクタープラスミド pHN170、pHN171の構築図である。図中に制限酵素認識部位と構造遺伝子の位置を示す。数字は塩基対(キロベースペア：kb)を示す。CIAPはCalf Intestine Alkaline Phosphataseを意味する。

図7は、マルチクローニング部位を持つ誘導型発現ベクタープラスミド pTip-NH1、pTip-CH1、pTip-LNH1、pTip-LCH1の構築図である。図中に制限酵素認識部位と構造遺伝子の位置をしめす。数字は塩基対(キロベースペア：kb)を示す。

図8は、マルチクローニング部位を持つ誘導型発現ベクタープラスミド pTip-NH2、pTip-CH2、pTip-LNH2、pTip-LCH2の構築図である。図中に制限酵素認識部位と構造遺伝子の位置をしめす。数字は塩基対(キロベースペア：kb)を示す。

図9 aは、pTip-NH1、pTip-CH1、pTip-LNH1、pTip-LNH1、pTip-NH2、pTip-CH2、pTip-LNH2、pTip-LCH2のマップを示す図である。各領域の機能と、プラスミドのマップを示す。

図9 bは、pTip-NH1、pTip-LNH1の *TipA* 遺伝子プロモーター配列、または

*TipA-LG10* プロモーター配列から、マルチクローニング部位、*ThcA* 遺伝子転写終結配列までの DNA 配列を示す。

図 9 c は、pTip-CH1、pTip-LCH1 の *TipA* 遺伝子プロモーター配列、または *TipA-LG10* プロモーター配列から、マルチクローニング部位、*ThcA* 遺伝子転写終結配列までの DNA 配列を示す。

図 9 d は、pTip-NH2、pTip-LNH2 の *TipA* 遺伝子プロモーター配列、または *TipA-LG10* プロモーター配列から、マルチクローニング部位、*ThcA* 遺伝子転写終結配列までの DNA 配列を示す。

図 9 e は、pTip-CH2、pTip-LCH2 の *TipA* 遺伝子プロモーター配列、または *TipA-LG10* プロモーター配列から、マルチクローニング部位、*ThcA* 遺伝子転写終結配列までの DNA 配列を示す。

図 10 は、pTip-CH1.1、pTip-LCH1.1、pTip-CH2.1 および pTip-LCH2.1 のマップを示す図である。

図 11 は、PIP 活性測定のためのコントロールプラスミド pHN172、pHN173 の構築図である。図中に制限酵素認識部位と構造遺伝子の位置を示す。数字は塩基対（キロベースペア：kb）を示す。また、CIAP は Calf Intestine Alkaline Phosphatase を意味する。pHN170 は、「Expression cassette」と「Inducer cassette」両方をもつものに対して、pHN173 は「Expression cassette」のみをもち、pHN172 は両 cassette を持たない。

図 12 は、*TipA* 遺伝子プロモーター配列を示す図である。

図 13 は、*TipA* 遺伝子プロモーターの *TipA-LG10* プロモーターへの改良を示す図である。

図 14 は、pRE8424 のマップを示す図である。図中には主な制限酵素認識部位が示されていて、オープンリーディングフレーム（ORF）が矢印で示されている。DS0 と SS0 の位置が四角で示されている。

図 15 は、pRE8424、pAP1、pBL1、pJV1、pIJ101、pSN22 の Rep タンパク質の 5 カ所の保存された領域（Motif IV、Motif I、Motif II、Motif III、C-terminal motif）のアミノ酸配列を示す図である。Rep タンパク質の機能に重要とされるチロシン残基は四角で囲ってある。

図 1 6 は、pRE8424、pAP1、pBL1、pJV1、pIJ101、pSN22 の DSO と考えられる配列のうち、特に保存された DNA 配列を示す図である。

図 1 7 は、pRE8424 の SS0、即ち配列表中の配列番号 9 0 のうちヌクレオチド番号 5268 から 5538 の配列と、その取りうる二次構造を示す図である。

図 1 8 - 1 は、pTip ベクターのマップを示す図である。

図 1 8 - 2 は、pNit ベクターのマップを示す図である。

図 1 9 は、*TipA-LG10p* - MCS - *ALDHt*、*Nit-LG10* - MCS - *ALDHt* の DNA 配列を示す図である。*TipA* 遺伝子プロモーターの野生型-10 領域配列は CAGCGT で、*Nit* プロモーターの-10 領域配列は TATAAT で、おのおの四角で囲まれている。

図 2 0 は、*R. erythropolis* JCM3201 株を pHN380、pHN410、pHN381、pHN387、pHN389 で、形質転換し、PIP のペプチダーゼ活性を測定した結果を示す図である。

図 2 1 は、PIP、GFP を不和合性を起こさない 2 つのベクターに組み込み、単一の *R. erythropolis* JCM3201 細胞で、発現、精製し、SDS ポリアクリルアミド電気泳動結果後、ゲルをクマシーブリリアントグリーン G-250 で染色した結果を示す写真である。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれら実施例にその技術的範囲が限定されるものではない。

##### 〔参考例 1〕

(1) *Rhodococcus erythropolis* 由来の、*Rhodococcus* 属細菌内で自律複製可能なプラスミドの分離とその一部 DNA 配列の決定

*Rhodococcus erythropolis* と大腸菌の複合ベクターを作成するために、まず *Rhodococcus* 属細菌内に存在する小型の内在性プラスミドを検索した。すると、*Rhodococcus erythropolis* JCM2895 株にその存在が確認された。このプラスミドに pRE2895 と名前を付けた。以下にプラスミドの分離と、その DNA 配列決定について具体的に述べる。

*Rhodococcus erythropolis* JCM2895 株を 5 ml の LB 培地 (1% Difco Bacto Tryptone、0.5% Difco Yeast Extract、1.0% 塩化ナトリウム) にて、30 °C で 30



時間培養した菌体から QIAprep Spin Miniprep Kit(QIAGEN 社製)を用いて pRE2895 を精製した。この際、Buffer P1 250  $\mu$ l に懸濁後、Buffer P2 250  $\mu$ l を加える前に、5  $\mu$ l のリゾチーム (100 mg/ml) を加え 37  $^{\circ}$ C で 30 分インキュベートした点を除いては、使用説明書通りに作業した。

上記 DNA サンプルを制限酵素 *Eco*RI で処理し、1.0% アガロースゲル電気泳動 (100 V、30 分) に供したところ、約 5.4 kb の DNA 断片 1 本の存在が確認された。

この約 5.4 kb の DNA 断片をゲルから切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製) を用いて、使用説明書通りに精製した。得られた *Eco*RI 断片を常法 (Sambrook et al., Molecular Cloning: a laboratory manual, 2nd edition [1989], Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.) に従って、プラスミド pBluescript II SK (+) (STRATAGENE 社製) の *Eco*RI 部位にサブクローンし、このプラスミドに pHN79 と名前を付けた。

pHN79 を Reverse、M13-20 両プライマー (共に STRATAGENE 社製) を用い、DNA シークエンサー ABI PRISM(R) 3100 Genetic Analyzer (ABI 社製) を用いて、使用説明書に準じて、pHN79 の塩基配列を約 400 塩基ずつそれぞれ決定した。相同性検索の結果、pHN79 にサブクローンされた *Rhodococcus erythropolis* JCM2895 株由来の DNA 領域はその 99.8% の配列が GenBank に受入番号 AF312210 として登録されている 5403 塩基対の環状 DNA、pN30 と一致した。

分離した pRE2895 は全塩基配列を決定しなかったが、pN30 との相同性は極めて高く、また制限酵素切断地図も pN30 の配列から予想されるものと一致したことから、これらの相同性はプラスミド全体にわたっていると予想された。また、pN30 は *Mycobacterium fortuitum* 002 株から分離された内在性プラスミド pAL5000 (Rauzer et al., Gene 71 315-321 [1988], Stolt and Stoker, Microbiology 142 2795-2802 [1996]), *Rhodococcus erythropolis* NI86/21 株から分離された pFAJ2600 (De Mot et al., Microbiology 143 3137-3147 [1997]) と相同性が高く、類似の機構で自律複製していると考えられた。pAL5000 は推定 *RepA* 遺伝子、推定 *RepB* 遺伝子、推定複製開始点を含む領域のみで各細菌内で自律複製するために十分であるため、本発明者らが分離した pRE2895 も同様の領域のみを発現ベクター中に組み込めば、*Rhodococcus* 属細菌内で自律複製するために十分と考えら

れた。

## (2) ベクタープラスミド pHN136 の構築

前記(1)で分離した pRE2895 の一部と大腸菌内で自律複製可能なプラスミドの一部を用いて両菌の複合ベクターを作成するため以下の作業を行った(図1)。

プラスミド pBluescript II SK (-) (STRATAGENE 社製)をテンプレートとして、配列表中の配列番号1、2に記載の合成オリゴデオキシリボヌクレオチドプライマー(以下プライマーと略記)を用いて、ポリメラーゼチェーンリアクション法(以下、PCRと略記: Saiki et al., Science, 239 487-491 [1988])によるDNAの増幅を行った。なお、用いたPCR用の酵素は Pfu turbo (STRATAGENE 社製)である。その結果、アンピシリン耐性遺伝子(図中においては Amp<sup>r</sup>と表記)と大腸菌内で自律複製させるために必要な *ColE1* 配列領域を含む 2.0kb の増幅されたDNAを得た。このDNA断片を制限酵素 *SacI* と *BsrGI* で二重消化し、1.0%アガロースゲル電気泳動(100 V、30 分)に供し、該DNA断片を切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit を用いて、使用説明書に準じて精製した。

一方、pN30(前記(1))の配列をもとに *Rhodococcus* 属細菌内で自律複製するために必要と思われる領域を増幅するプライマーを設計した。なお、同プライマーの配列は配列表中の配列番号3、4で示される。プラスミド pHN79をテンプレートとして、両プライマーを用いてPCRによる増幅を行ったところ 1.9 kb の増幅されたDNAを得た。このDNA断片を制限酵素 *BsrGI* と *SacI* で二重消化し、1.0%アガロースゲル電気泳動(100 V、30 分)に供し、該DNA断片を切り出し、上述の方法と同様に精製した。

上記2つの精製されたDNA断片をDNA Ligation Kit Ver. 2(宝酒造社製)を用いて、使用説明書通りにライゲーションし、得られたプラスミドに pHN129 と名前を付けた。

次に pHN129 に存在する制限酵素認識部位 *BamHI*、*SaII* を除去するため以下の作業をおこなった。まず、pHN129 をテンプレートとして、配列表中の配列番号5、6に記載のプライマーを用いて、PCRによる増幅を行った。このPCR断片を *BglII* と *PstI* で二重消化して得られた 0.5 kb のDNA断片を pHN129 の *BamHI*、*PstI* 部位にサブクローンした。結果、*BglII* と *BamHI* で連結された部分においては推定 *RepA*

遺伝子のオープンリーディングフレーム（以下 ORF と略記）内であるが、コードされるアミノ酸が置換されることなく、*Bam*HI 認識部位が除去された。また *Sa*II 認識部位は *Bam*HI 認識部位のごく近傍に存在したが、配列番号 5 に記載のプライマー中において、*Sa*II 認識部位が除かれ、かつ、コードされるアミノ酸が置換されないよう設計されていることから、*Bam*HI 認識部位と同時に *Sa*II 認識部位も除去されている。このプラスミドに pHN135 と名前を付けた。

次に pHN135 に存在する制限酵素認識部位 *Bg*III を除去するため以下の作業をおこなった。まず、プラスミド pHN135 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 5、6 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。この PCR 断片を *Pst*I と *Bam*HI で二重消化して得られた 0.5 kb の DNA 断片を pHN135 の *Pst*I、*Bg*III 部位にサブクローンした。結果、*Bam*HI と *Bg*III で連結された部分においては推定 *RepB* 遺伝子の ORF 部分であるが、コードされるアミノ酸が置換されることなく、*Bg*III 認識部位が除去された。この結果得られたプラスミドに pHN136 と名前をつけた。

### （３）ベクタープラスミド pHN143 の構築

タンパク質の発現誘導には抗生物質チオストレプトンを用いるが、*Rhodococcus erythropolis* は同物質に対して感受性であるために、耐性を付与させなければならない。そこで *Streptomyces azureus* が持つチオストレプトン耐性遺伝子、*tsr* 遺伝子 (Bibb et al., Mol. Gen. Genet. 199 26-36 [1985] : 図中においては、Thio<sup>I</sup> と表記する) を複合ベクター中に組み込むこととした。なお、この遺伝子が *Rhodococcus erythropolis* 内で機能し、チオストレプトン耐性を付与することはすでに報告されている (Shao and Behki, Lett. Appl. Microbiol. 21 261-266 [1995])。以下に、同遺伝子の分離について具体的に述べる (図 2)。

まず、PCR のテンプレートに使用する *Streptomyces azureus* JCM4217 株のゲノム DNA を以下のように調製した。5ml の SB 培地 (1% Difco Bacto Tryptone、0.5% Difco Yeast Extract、0.5% 塩化ナトリウム、0.1% Glucose、5 mM 塩化マグネシウム、0.5% グリシン) にて 30 °C で培養した同菌株を 500 µl の SET バッファー (75 mM 塩化ナトリウム、25 mM EDTA [pH8.0]、20 mM Tris-HCl [pH7.5]) に懸濁した。そこに、5 µl のリゾチーム溶液 (100 mg/ml) を加え、37 °C で 30

分インキュベートした。そして、14  $\mu$ l のプロテアーゼ K 溶液 (20 mg/ml) と 60  $\mu$ l の硫酸ドデシルナトリウム溶液 (10%) を加え、よく混合した後 55  $^{\circ}$ C で 2 時間インキュベートした。その後、200  $\mu$ l の塩化ナトリウム溶液 (5 M) と 500  $\mu$ l のクロロホルムを加え、20 分間室温で回転撹拌した。遠心分離し、700  $\mu$ l の上清をとった。これをイソプロパノール沈殿後、乾燥させ、50  $\mu$ l の TE 溶液 (10 mM Tris-HCl [pH8.0]、1 mM EDTA [pH8.0]) に溶解した。

上記のように精製した *Streptomyces Azureus* JCM4217 株のゲノム DNA をテンプレートとして、配列表中の配列番号 7、8 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。その結果、チオストレプトン耐性遺伝子を含む 1.1 kb の増幅された DNA を得た。なおこの DNA 断片はプラチナ Pfx DNA ポリメラーゼ (Gibco BRL 社製) を用いたため、その末端は平滑末端である。この DNA 断片を精製し、常法 (Sambrook et al., Molecular Cloning: a laboratory manual, 2nd edition [1989], Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.) に従い 5' 末端を T4-ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した後、プラスミド pGEM-3Zf (+) (Promega 社製) の *Hinc*II 部位にサブクローンした (サブクローンされた向きは DNA の 5' 方向から *Hind*III 認識部位-*tsr* 遺伝子 ORF-*Eco*RI 認識部位である)。このプラスミドに pHN137 と名前を付けた。

次に pHN137 に存在する制限酵素認識部位 *Sa*I を除去するため以下の作業をおこなった。まず、プラスミド pHN137 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 9、10 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。なおこの PCR にはプラチナ Pfx DNA ポリメラーゼを用いた。この PCR 断片の片方の末端を *Hind*III で消化して得られた 0.6 kb の DNA 断片を精製し、さらに常法により平滑末端側の 5' 末端を T4-ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した。一方、プラスミド pHN137 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 11、12 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。なおこの PCR にはプラチナ Pfx DNA ポリメラーゼを用いた。この PCR 断片の片方の末端を *Eco*RI で消化して得られた 0.5 kb の DNA 断片を精製し、さらに常法により平滑末端側の 5' 末端を T4-ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した。これら 2 つの PCR 断片を同時にプラスミド pGEM-3Zf (+) の *Hind*III、*Eco*RI 部位にサブクローンした結果、平滑末端同士

で連結された部分においては *tsr* 遺伝子の ORF 部分であるが、コードされるアミノ酸が置換されることなく、*Sa*II 認識部位が除去された。このプラスミドに pHN143 と名前を付けた。

#### (4) ベクタープラスミド pHN62 の構築

チオストレプトンによって誘導型発現をさせるためには *Rhodococcus* 属細菌内に TipA タンパク質を存在させなければならない。そのために、*Rhodococcus erythropolis* から構成的なプロモーターを分離し、その下流に TipA タンパク質をコードする構造遺伝子を連結した (図 3)。構成的に機能するプロモーターとしては *Rhodococcus erythropolis* のアルデヒドデヒドロゲナーゼ様タンパク質をコードする *ThcA* 遺伝子 (Nagy et al., J. Bacteriol. 177 676-687 [1995]) のプロモーター配列を用いた。

テンプレートに使用する *Streptomyces coelicolor* A3 (2) 株のゲノム DNA は *Streptomyces azureus* からゲノム DNA を調製したときと同様に作業し、精製した。また、*Rhodococcus erythropolis* JCM3201 株のゲノム DNA は 5 ml の LB 培地で培養した点を除いては *Streptomyces azureus* からゲノム DNA を調製したときと同様に作業し、精製した。

上述のように精製した *Streptomyces coelicolor* A3 (2) 株のゲノム DNA をテンプレートとして、配列表中の配列番号 13、14 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。なおこの PCR にはプラチナ Pfx DNA ポリメラーゼを用いた。その結果、*TipA* 遺伝子の ORF 並びにその下流の転写終結配列を含む DNA (図中においては TipA と表記) を得た。

この PCR 断片の片方の末端を *Bgl*II で消化して得られた 0.9 kb の DNA 断片を精製し、さらに常法により平滑末端側の 5' 末端を T4-ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した。一方、上述のように精製した *Rhodococcus erythropolis* JCM3201 株のゲノム DNA をテンプレートとして、配列表中の配列番号 15、16 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。その結果、アルデヒドデヒドロゲナーゼ様タンパク質をコードする *ThcA* 遺伝子 (Nagy et al., J. Bacteriol. 177 676-687 [1995]) のプロモーター配列 (図中においては ALDHp と表記) を含む DNA を得た。なおこの PCR にはプラチナ Pfx DNA ポリメラーゼを

用いた。この PCR 断片の片方の末端を *Xba*I で消化して得られた 0.2 kb の DNA 断片を精製し、さらに常法により平滑末端側の 5' 末端を T4-ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した。これら 2 つの PCR 断片を同時にプラスミド pGEM-3Zf (+) の *Xba*I、*Bam*HI 部位にサブクローンした結果、*ThcA* 遺伝子のプロモーター配列のすぐ下流に *TipA* 遺伝子の ORF 並びに転写終結配列を含むプラスミドが作成され、pHN33 と名前を付けた。

次に pHN33 に存在する制限酵素 *Nco*I 認識部位 2 カ所（以下、*Nco*I (1)、*Nco*I (2) と表記する）を除去するため以下の作業をおこなった。

まず、プラスミド pHN33 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 9、17 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。なおこの PCR にはプラチナ Pfx DNA ポリメラーゼを用いた。この PCR 断片の片方の末端を *Xba*I で消化して得られた 0.5 kb の DNA 断片を精製し、さらに常法により平滑末端側の 5' 末端を T4-ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した。一方、プラスミド pHN33 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 18、12 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。なおこの PCR にはプラチナ Pfx DNA ポリメラーゼを用いた。この PCR 断片の片方の末端を *Kpn*I で消化して得られた 0.6 kb の DNA 断片を精製し、さらに常法により平滑末端側の 5' 末端を T4-ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した。これら 2 つの PCR 断片を同時にプラスミド pGEM-3Zf (+) の *Xba*I、*Kpn*I 部位にサブクローンした結果、平滑末端同士で連結された部分においては *TipA* 遺伝子の ORF 部分であるが、コードされるアミノ酸が置換されることなく、*Nco*I (1) 認識部位が除去された。このプラスミドに pHN50 と名前を付けた。

次に pHN33 に存在する制限酵素認識部位 *Nco*I (2) を除去するため以下の作業をおこなった。まず、プラスミド pHN33 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 9、19 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。なおこの PCR にはプラチナ Pfx DNA ポリメラーゼを用いた。この PCR 断片の片方の末端を *Xba*I で消化して得られた 0.8 kb の DNA 断片を精製し、さらに常法により平滑末端側の 5' 末端を T4-ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した。一方、プラスミド pHN33 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 20、12 に記載のプライマ

ーを用いて、PCR による増幅を行った。なおこの PCR にはプラチナ Pfx DNA ポリメラーゼを用いた。この PCR 断片の片方の末端を *KpnI* で消化して得られた 0.3 kb の DNA 断片を精製し、さらに常法により平滑末端側の 5' 末端を T4-ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した。これら 2 つの PCR 断片を同時にプラスミド pGEM-3Zf (+) の *XbaI*, *KpnI* 部位にサブクローンした結果、平滑末端同士で連結された部分においては *TipA* 遺伝子の ORF 部分であるが、コードされるアミノ酸が置換されることなく、*NcoI* (2) 認識部位が除去された。このプラスミドに pHN51 と名前を付けた。

最後に以下の作業を行った。pHN50 を *XbaI* と *SacI* で二重消化して得られた 0.7kb の DNA 断片と pHN51 を *SacI* と *KpnI* で二重消化した 0.4kb の断片を同時にプラスミド pGEM-3Zf (+) の *XbaI*, *KpnI* 部位にサブクローンした。結果、*NcoI* (1) と *NcoI* (2) 両方の制限酵素部位を欠いた *TipA* 遺伝子を持つプラスミドを取得し、これに pHN62 と名前をつけた。

#### (5) ベクタープラスミド pHN153 の構築

目的のタンパク質を誘導的に発現せしめることができるかどうか確認するために、*TipA* 遺伝子のプロモーターの下流にレポーター遺伝子として *Thermoplasma acidophilum* 由来のプロリンイミノペプチダーゼ (Tamura et al., FEBS Lett. 398 101-105 [1996] : 以下 PIP と略記する) をコードする遺伝子の ORF (図中においては PIP ORF と表記) を連結し、さらにその下流に転写のリードスルーを抑制するために転写終結配列を連結した。以下に具体的に述べる (図 4)。

前記 (4) にて精製した *Streptomyces coelicolor* A3 (2) 株のゲノム DNA をテンプレートとして、配列表中の配列番号 21、22 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。その結果、*TipA* 遺伝子のプロモーター配列 (図中においては TipAp と表記) を含む 0.2 kb の増幅された DNA を得た。なおこの PCR にはプラチナ Pfx DNA ポリメラーゼを用いた。この断片を精製し、常法により 5' 末端を T4-ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した後、プラスミド pBluescript II SK (+) の *SmaI* 部位にサブクローンした (サブクローンされた向きは DNA の 5' 方向から *KpnI* 認識部位-*TipA* 遺伝子プロモーター配列-*SacI* 認識部位である)。このプラスミドに pHN150u と名前を付けた。

次に、プラスミド pRSET-PIP (Tamura et al., FEBS Lett. 398 101-105 [1996] : 以下 PIP と略記する) をテンプレートとして、配列表中の配列番号 23, 24 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。なお、配列表中の配列番号 24 のプライマーは PIP 遺伝子の終止コドンを除いて、かつタンパク質の精製を容易にするために 6×His タグが PIP タンパク質の C 末端に付くように設計されている。6×His タグは、6 つの連続したヒスチジン残基から成る連続配列で、これを融合したタンパク質は、ニッケルイオン等に高い親和性を示すようになる。従って、ニッケルイオン等を用いた金属キレートクロマトグラフィーで精製が容易になる (Crowe et al., Methods Mol. Biol. 31 371-387 [1994])。この PIP 遺伝子を含む 0.9 kb の DNA 断片を制限酵素 *NcoI* と *SpeI* で二重消化し、pHN150u の *NcoI*, *SpeI* 部位にサブクローンした結果、*TipA* 遺伝子のプロモーター配列のすぐ下流に PIP 遺伝子の ORF を含むプラスミドが作成され、pHN151u と名前を付けた。

次に、前記 (4) にて精製した *Rhodococcus erythropolis* JCM3201 株のゲノム DNA をテンプレートとして、配列表中の配列番号 25, 26 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。その結果、*ThcA* 遺伝子の転写終結配列 (Nagy et al., J. Bacteriol. 177 676-687 [1995] : 図中においては ALDht と表記) を含む DNA を得た。この 0.2kb の DNA 断片を制限酵素 *SpeI* と *XbaI* で二重消化し、pHN151u の *SpeI*, *XbaI* 部位にサブクローンした。その結果、*TipA* 遺伝子のプロモーター配列のすぐ下流に PIP 遺伝子の ORF を含み、またそのすぐ下流に *ThcA* 遺伝子の転写終結配列を含むプラスミドが作成され、pHN153 と名前を付けた。

#### (6) ベクタープラスミド pHN169 の構築

*Rhodococcus erythropolis* をプラスミドで形質転換するためには適当な形質転換マーカーが必要になる。そこで *Rhodococcus* 属細菌内で機能する強力なプロモーターの下流に薬剤耐性遺伝子を連結し、使用することとした。プロモーターとしては、*Streptomyces* 属細菌由来の Elongation factor Tu をコードする *TufI* 遺伝子プロモーターを用いることとしたが、これは同プロモーターが強力に下流の遺伝子を転写せしめるとの報告があるからである (Wezel et al., Biochim. Biophys. Acta 1219 543-547 [1994])。また、薬剤耐性遺伝子は入手が容易なテ



トラサイクリン耐性遺伝子を用いた。以下に具体的に述べる（図5）。

前記（4）にて精製した *Streptomyces coelicolor* A3 (2) 株のゲノム DNA をテンプレートとして、配列表中の配列番号 27、28 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。その結果、*Tuf1* 遺伝子のプロモーター配列（図中においては *Tuf1p* と表記）を含む 0.2 kb の増幅された DNA を得た。なおこの PCR にはプラチナ Pfx DNA ポリメラーゼを用いた。この断片を精製し、常法により 5' 末端を T4-ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した後、プラスミド pBluescript II SK (+) の *HincII* 部位にサブクローンした（サブクローンされた向きは DNA の 5' 方向から *KpnI* 認識部位-*Tuf1* 遺伝子プロモーター配列-*EcoRI* 認識部位である）。

このプラスミドに pHN158 と名前を付けた。

次に、プラスミド pACYC184 (Rose, Nucleic Acids Res. 16 355 [1988]) をテンプレートとして、配列表中の配列番号 29、30 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。その結果、テトラサイクリン耐性遺伝子（図中においては *Tet<sup>r</sup>* と表記）を含む DNA を得た。この 1.3kb の DNA 断片を制限酵素 *XhoI* と *SpeI* で二重消化し、pHN158 の *SalI*、*SpeI* 部位にサブクローンした結果、*Tuf1* 遺伝子のプロモーター配列のすぐ下流にテトラサイクリン耐性遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN159 と名前を付けた。

次に pHN159 に存在する制限酵素認識部位 *BamHI* を除去するため以下の作業をおこなった。まず、プラスミド pHN159 をテンプレートとして、配列表 31、32 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。なおこの DNA 断片は Pfu turbo DNA ポリメラーゼを用いたため、その末端は平滑末端である。この PCR 断片の片方の末端を *XhoI* で消化して得られた 0.5 kb の DNA 断片を精製し、さらに常法により平滑末端側の 5' 末端を T4-ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した。一方、プラスミド pHN159 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 33、34 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。なおこの PCR には Pfu turbo DNA ポリメラーゼを用いた。この PCR 断片の片方の末端を *NotI* で消化して得られた 1.1kb の DNA 断片を精製し、さらに常法により平滑末端側の 5' 末端を T4-ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した。これら 2 つの PCR 断片を

同時にプラスミド pBluescript II SK (+) の *Xho*I、*Not*I 部位にサブクローンした結果、平滑末端同士で連結された部分においてはテトラサイクリン耐性遺伝子の ORF 部分であるが、コードされるアミノ酸が置換されることなく、*Bam*HI 部位が除去された。このプラスミドに pHN165 と名前を付けた。

次に pHN159 に存在する制限酵素認識部位 *Sa*I を除去するため以下の作業をおこなった。まず、プラスミド pHN159 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 3 1、3 5 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。なおこの PCR には Pfu turbo DNA ポリメラーゼを用いた。この PCR 断片の片方の末端を *Xho*I で消化して得られた 0.8 kb の DNA 断片を精製し、さらに常法により平滑末端側の 5' 末端を T4-ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した。一方、プラスミド pHN159 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 3 6、3 4 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。なおこの PCR には Pfu turbo DNA ポリメラーゼを用いた。この PCR 断片の片方の末端を *Not*I で消化して得られた 0.8 kb の DNA 断片を精製し、さらに常法により平滑末端側の 5' 末端を T4-ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した。これら 2 つの PCR 断片を同時にプラスミド pBluescript II SK (+) の *Xho*I、*Not*I 部位にサブクローンした結果、平滑末端同士で連結された部分においてはテトラサイクリン耐性遺伝子の ORF 部分であるが、コードされるアミノ酸が置換されることなく、*Sa*I 認識部位が除去された。このプラスミドに pHN166 と名前を付けた。

最後に以下の作業を行った。pHN166 を *Sph*I と *Spe*I で二重消化して得られた 0.9 kb の DNA 断片を pHN165 の *Sph*I、*Spe*I 部位にサブクローンした。結果、*Bam*HI と *Sa*I 両方の制限酵素認識部位を欠くテトラサイクリン耐性遺伝子クローンを取得し、このプラスミドに pHN169 と名前をつけた。

#### (7) ベクタープラスミド pHN170、pHN171 の構築

前記 (2) から (6) までに分離してきた遺伝子群を連結し、*Rhodococcus* 属細菌内で誘導可能な発現ベクターを構築するために以下の作業を行った (図 6)。

pHN143 を *Sac*I で消化して得られた 1.1 kb の DNA 断片を pHN136 の *Sac*I 部位にサブクローンした (サブクローンされた向きは DNA の 5' 方向から推定 *RepB* 遺伝子 ORF-*tsr* 遺伝子 ORF-アンピシリン耐性遺伝子 ORF である)。その結果できたプ

ラスミドに pHN144 と名前をつけた。

次に、pHN62 を *Xba*I と *Kpn*I で二重消化して得られた 1.1 kb の DNA 断片を pHN144 の *Xba*I、*Kpn*I 部位にサブクローンした。その結果できたプラスミドに pHN152 と名前をつけた。

次に、pHN153 を *Bsr*GI と *Xba*I で二重消化して得られた 1.2 kb の DNA 断片を pHN152 の *Bsr*GI、*Spe*I 部位にサブクローンした。その結果できたプラスミドに pHN154 と名前をつけた。

次に、pHN169 を *Xba*I と *Spe*I で二重消化して得られた 1.6 kb の DNA 断片を pHN154 の *Xba*I 部位にサブクローンした（サブクローンされた向きは DNA の 5' 方向から *tsr* 遺伝子 ORF-テトラサイクリン耐性遺伝子 ORF-*ThcA* 遺伝子プロモーター配列である）。その結果 *TipA* 遺伝子プロモーターの制御下に置かれた *PIP* 遺伝子を含むプラスミドが作成され、できたプラスミドに pHN170 と名前をつけた。

また組み換えタンパク質の高発現化のため、*TipA* 遺伝子プロモーター下流のリボソーム結合部位を翻訳効率の良いとされるラムダファージ *gene10* 由来の配列（Gold and Stormo, Methods Enzymol. 185 89-93 [1990]）に変化させた（図 6）。以下に具体的に述べる。

プラスミド pHN170 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 21, 37 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。その結果、*TipA* 遺伝子プロモーターとラムダファージ *gene10* 由来リボソーム結合部位からなるハイブリッドプロモーター（以下 *TipA-LG10* プロモーターと表記する：図中に置いては *TipA-LG10p* と表記）を得た。この 0.2 kb の DNA 断片を制限酵素 *Bsr*GI と *Nco*I で二重消化し、pHN170 の *Bsr*GI、*Nco*I 部位にサブクローンした。その結果 *TipA-LG10* プロモーターの制御下に置かれた *PIP* 遺伝子を含むプラスミドが作成され、できたプラスミドに pHN171 と名前をつけた。図 12 に *TipA* プロモーター配列を、図 13 に *TipA* プロモーターの *TipA-LG10* プロモーターへの改変のためのリボソーム結合部位 (RBS) 配列の改良を示す。

(8) ベクタープラスミド pTip-NH1、pTip-CH1、pTip-LNH1、pTip-LCH1 の構築前記 (7) で述べたプラスミドからレポーターである *PIP* 遺伝子を除き、マルチクローニング部位を導入するため以下の作業を行った（図 7）。

配列表中の配列番号 38、39 に記載の合成オリゴデオキシリボヌクレオチドはマルチクローニング部位になる配列を含み、お互いに相補的な配列を持つ。これら 2 つを等モル量ずつ混合し、70 °C で 10 分処理し、20 分かけて室温に冷却し、2 本鎖化させた。その結果、その末端は *Nco*I と *Spe*I で二重消化されたベクターと連結可能な状態になり、この 2 本鎖化した合成 DNA (図中においては MCS Linker NNco と表記) を pHN170 の *Nco*I、*Spe*I 部位にサブクローンした。その結果できたプラスミドに pTip-NH1 と名前をつけた。また、配列表中の配列番号 40、41 に記載の合成オリゴデオキシリボヌクレオチド (マルチクローニング部位になる配列を含み、お互いに相補的な配列を持つ) を同様に 2 本鎖化させた合成 DNA (図中においては MCS Linker CNco と表記) を pHN170 の *Nco*I、*Spe*I 部位にサブクローンした。その結果できたプラスミドに pTip-CH1 と名前をつけた。

前記 (7) で述べた *TipA* 遺伝子プロモーター配列とラムダファージ *gene10* 由来リボソーム結合部位からなるハイブリッド DNA を制限酵素 *Bsr*GI と *Nco*I で二重消化し、pTip-NH1 と pTip-CH1 の *Bsr*GI、*Nco*I 部位にそれぞれサブクローンした。結果得られたプラスミドに pTip-LNH1、pTip-LCH1 とそれぞれ名前を付けた。

(9) ベクタープラスミド pTip-NH2、pTip-CH2、pTip-LNH2、pTip-LCH2 の構築  
前記 (8) で述べたプラスミド pTip-NH1、pTip-CH1、pTip-LNH1、pTip-LCH1 において、マルチクローニング部位の最も上流の *Nco*I 部位を *Nde*I に変更するために以下の作業を行った (図 8)。

プラスミド pHN170 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 21、42 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。その結果、*TipA* 遺伝子プロモーターを含む DNA を得た。この 0.2 kb の DNA 断片を制限酵素 *Bsr*GI と *Nde*I で二重消化し、pHN170 の *Bsr*GI、*Nde*I 部位にサブクローンした。結果得られたプラスミドに pHN183 と名前を付けた。

配列表中の配列番号 43、44 に記載の合成オリゴデオキシリボヌクレオチドはマルチクローニング部位になる配列を含み、お互いに相補的な配列を持つ。これら 2 つを等モル量ずつ混合し、70 °C で 10 分処理し、20 分かけて室温に冷却し、2 本鎖化させた。その結果、その末端は *Nde*I と *Spe*I で二重消化されたベクターと連結可能な状態になり、この 2 本鎖化した合成 DNA (図中においては MCS Linker

NNde と表記) を pHN183 の *Nde*I、*Spe*I 部位にサブクローンした。その結果できたプラスミドに pTip-NH2 と名前をつけた。また、配列表中の配列番号 45、46 に記載の合成オリゴデオキシリボヌクレオチド (マルチクローニング部位になる配列を含み、お互いに相補的な配列を持つ) を同様に 2 本鎖化させた合成 DNA (図中においては MCS Linker CNde と表記) を pHN183 の *Nde*I、*Spe*I 部位にサブクローンした。その結果できたプラスミドに pTip-CH2 と名前をつけた。

プラスミド pTip-LNH1 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 21、47 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。その結果、*TipA* 遺伝子プロモーターとラムダファージ *gene10* 由来リボソーム結合部位からなるハイブリッド DNA を得た。この 0.2kb の DNA 断片を制限酵素 *Bsr*GI と *Nde*I で二重消化し、pTip-NH2 と pTip-CH2 の *Bsr*GI、*Nde*I 部位にそれぞれサブクローンした。結果得られたプラスミドに pTip-LNH2、pTip-LCH2 とそれぞれ名前を付けた。

前記 (8)、(9) で作成したプラスミドのマップと、マルチクローニング部位周辺の配列をまとめて図 9 に示す。該図中、実線の矢印は *TipA* 遺伝子プロモーター中に存在する Inverted repeat 配列を示す。斜線の矢印は *ThcA* 遺伝子転写終結配列に存在する Inverted repeat 配列を示す。また、原核生物のプロモーター領域に一般的に存在し、遺伝子の転写に重要な -10 領域、-35 領域、RBS は四角で囲んである。また RBS の中でも最も重要な SD 配列 (Shine and Dalgarno, Eur. J. Biochem. 57 221-230 [1975]) は下線を引いてある。

(10) ベクタープラスミド pTip-CH1.1、pTip-CH2.1、pTip-LCH1.1、pTip-LCH2.1 の構築

前記 (8) 及び (9) で述べたプラスミド pTip-CH1、pTip-CH2、pTip-LCH1、pTip-LCH2 において、マルチクローニング部位の *Xho*I 部位以降の読み枠を市販の pET ベクター (Novagen 社) の読み枠と一致させるために以下の作業を行った (図 10)。

プラスミド pTip-CH1 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 21、48 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。その結果、*TipA* 遺伝子プロモーターとマルチクローニング部位を含む DNA を得た。この 0.3 kb の DNA 断片を制限酵素 *Bsr*GI と *Spe*I で二重消化し、pTip-CH1 の *Bsr*GI、*Spe*I 部位にサブク

ローンした。結果得られたプラスミドに pTip-CH1.1 と名前を付けた。

プラスミド pTip-CH2 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 21、48 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。その結果、*TipA* 遺伝子プロモーターとマルチクローニング部位を含む DNA を得た。この 0.3 kb の DNA 断片を制限酵素 *Bsr*GI と *Spe*I で二重消化し、pTip-CH1 の *Bsr*GI、*Spe*I 部位にサブクローンした。結果得られたプラスミドに pTip-CH2.1 と名前を付けた。

プラスミド pTip-LCH1 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 21、48 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。その結果、*TipA-LG10* プロモーターとマルチクローニング部位を含む DNA を得た。この 0.3 kb の DNA 断片を制限酵素 *Bsr*GI と *Spe*I で二重消化し、pTip-CH1 の *Bsr*GI、*Spe*I 部位にサブクローンした。結果得られたプラスミドに pTip-LCH1.1 と名前を付けた。

プラスミド pTip-LCH2 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 21、48 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。その結果、*TipA-LG10* プロモーターとマルチクローニング部位を含む DNA を得た。この 0.3 kb の DNA 断片を制限酵素 *Bsr*GI と *Spe*I で二重消化し、pTip-CH1 の *Bsr*GI、*Spe*I 部位にサブクローンした。結果得られたプラスミドに pTip-LCH2.1 と名前を付けた。

#### (11) ベクタープラスミド pHN172、pHN173 の構築

発現の誘導が厳密に調節されているかを調べるために以下のようなコントロール実験用プラスミドを作成した (図 11)。

pHN169 を *Xba*I と *Spe*I で二重消化して得られた 1.6 kb の DNA 断片を pHN144 の *Xba*I 部位にサブクローンした (サブクローンされた向きは DNA の 5' 方向から *tsr* 遺伝子 ORF-テトラサイクリン耐性遺伝子 ORF-アンピシリン耐性遺伝子 ORF である)。その結果できたプラスミドに pHN172 と名前をつけた。

次に、pHN153 を *Bsr*GI と *Xba*I で二重消化して得られた 1.2 kb の DNA 断片を pHN144 の *Bsr*GI、*Spe*I 部位にサブクローンした。その結果できたプラスミドに pHN164 と名前をつけた。次いで、pHN169 を *Xba*I と *Spe*I で二重消化して得られた 1.6 kb の DNA 断片を pHN164 の *Xba*I 部位にサブクローンした (サブクローンされた向きは DNA の 5' 方向から *tsr* 遺伝子 ORF-テトラサイクリン耐性遺伝子 ORF-アンピシリン耐性遺伝子 ORF である)。その結果できたプラスミドに pHN173 と名前

をつけた。

pHN170 は、*TipA* 遺伝子プロモーター、その下流に *PIP0RF*、さらにその下流に *ThcA* 遺伝子転写終結配列、の 3 因子が連結された遺伝子カセット（以下 Expression cassette と表記）と、*ThcA* 遺伝子プロモーター、その下流に *TipA* 遺伝子、の 2 因子が連結された遺伝子カセット（以下 Inducer cassette と表記）両方をもつ。

pHN173 は Expression cassette のみをもち、pHN172 は両 cassette を持たない。

#### （12） *Rhodococcus* 属細菌の形質転換

*Rhodococcus erythropolis* JCM3201 株を LB 培地 100 ml にて対数増殖期に至るまで 30℃ で振とう培養する。培養液を 30 分間氷冷し、遠心分離し、菌体を回収する。これに 100 ml の氷冷滅菌水を加え、よく攪拌し、再び遠心分離し、菌体を回収する。これに 100 ml の氷冷 10%グリセリン溶液を加え、よく攪拌し、遠心分離し、菌体を回収する。この氷冷 10%グリセリン溶液での洗浄をもう一度繰り返し、菌体を 5 ml の氷冷 10%グリセリン溶液に懸濁する。400  $\mu$ l ずつ分注し、液体窒素で瞬間冷凍し、使用するまで -80℃ にて保存した。-80℃ から菌体を取り出し、氷上にて融解し、プラスミド pHN170、または pHN172、または pHN173 を 3  $\mu$ l（それぞれ約 300 ng）加えた。この菌体と DNA の混合液をエレクトロポレーションキュベット（Bio-Rad 社：0.2 cm ギャップキュベット）に移し、同社の遺伝子導入装置ジーンパルサー II を用いて、電場強度 12.5 kV/cm で、パルスコントローラーの設定はキャパシタンス 25  $\mu$ F、外部抵抗 400  $\Omega$  にてそれぞれ電気パルスを与えた。電気パルス処理した菌体と DNA の混合液を 1 ml の LB 培地に混合し、30℃ にて 4 時間培養した後集菌し、20  $\mu$ g/ml テトラサイクリン入り LB 寒天培地（寒天は濃度 1.8%）に塗布し、30℃ にて 3 日培養し、それぞれの形質転換体を得た。

#### 〔実施例 1〕

##### 実験方法

まず、以下の実施例 2 から実施例 12 に書かれた実験に用いた手法を列挙する。

プラスミドは全て、常法（Sambrook et al., Molecular Cloning: a laboratory manual, 2nd edition [1989], Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring

Harbor, N. Y.) に従って構築した。ポリメラーゼチェーンリアクション法（以下、PCR と略記； Saiki et al., Science 239 487-491 [1988]）には全て Pfu turbo（STRATAGENE 社製）を用いた。プラスミドから切り出した DNA 断片は 1.0% アガロースゲル電気泳動に供し、目的の DNA 断片を切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit（Qiagen 社製）を用いて、使用説明書に準じて精製した。*Streptomyces coelicolor* A3 (2) 株、*R. erythropolis* DSM313 株のゲノム DNA の分離法、並びに *Rhodococcus* 属細菌からのプラスミド DNA の精製方法は参考例 1 に記載したものと同一である。大腸菌 ER2508 株 (New England Biolabs 社) のゲノム DNA は QIAGEN 社製 QIAGEN RNA/DNA Mini Kit を用い、使用説明書に準じて精製した。DNA 断片の 5' 末端をリン酸化する必要がある場合は東洋紡社製 T4 polynucleotide kinase を用いた。塩基配列決定には DNA シークエンサー ABI PRISM (R) 3100 Genetic Analyzer (ABI 社製) を用いた。リガーゼ反応には New England Biolabs 社製の T4 DNA ligase を用いた。

用いた主なプラスミド、菌株を表 1, 2 に示す。*Rhodococcus* 属細菌、*Streptomyces coelicolor* A3 (2) 株、大腸菌の培養は Luria Broth (LB; 1% Bacto trypton, 0.5% Bacto yeast extract, 1% 塩化ナトリウム) で行った。*Rhodococcus* 属細菌のコンピテントセル作成法、並びに形質転換法は参考例 1 に記されているが、予めプラスミドを保持している *Rhodococcus* 属細菌のコンピテントセルを作成する際には、適当な抗生物質を含んだ LB 培地で培養した菌体から行った。形質転換体を選択する際には、テトラサイクリン（液体培地では、 $8 \mu\text{g} / \text{ml}$ 、固体培地では  $20 \mu\text{g} / \text{ml}$ ）、クロラムフェニコール ( $34 \mu\text{g} / \text{ml}$ )、アンピシリン ( $50 \mu\text{g} / \text{ml}$ ) を用いた。

誘導型ベクターを用いて Proline iminopeptidase（以下 PIP）または、蛍光緑色タンパク質（以下 GFP）を *Rhodococcus* 属細菌にて発現させる際には、*Rhodococcus* 属細菌の形質転換体を適当な抗生物質を含む LB 培地で  $30^\circ\text{C}$  にて培養し、 $600 \text{ nm}$  の波長で測定したオプティカルデンシティー (O.D. 600) が 0.6 になった時点で、終濃度  $1 \mu\text{g} / \text{ml}$  になるようにチオストレプトン（溶媒はジメチルスルホキシド）を加え、さらに 16 時間培養を続けた。構成型ベクターを用いて発現させる際には、*Rhodococcus* 属細菌の形質転換体を適当な抗生物質を含



む LB 培地で 30 ℃ にて 0. D. 600 が 2. 0 になるまで培養した。

PIP のペプチダーゼ活性を測定する方法を以下に詳述する。上記のように PIP を発現させた *Rhodococcus* 属細菌の培養液を、8  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の適当な抗生物質を含む LB 培地で 200  $\mu\text{l}$  にメスアップし、60 ℃ にて 1 分加温する。そこに PIP の基質として 2  $\mu\text{l}$  の H-Pro- $\beta$  NA (100 mM ; 溶媒はジメチルスルホキシド) を加え 60 ℃ にて 20 分インキュベートする (PIP は 60 ℃ が至適温度)。PIP によって H-Pro- $\beta$  NA から加水分解されて遊離した  $\beta$  NA を観察するために、発色剤として 134  $\mu\text{l}$  の Fast Garnet GBC Salt 溶液 (和光純薬社製で濃度 0.5 mg / ml : 1 M 酢酸ナトリウムバッファー (pH 4.2)、10% Triton X-100 が溶媒) を加える。PIP が発現していなければ上記混合液は黄色を呈するが、発現していれば赤色を呈する。また、呈色した赤色を吸光分光光度計を用い、550 nm での吸光度 (A550) を測定し、PIP 活性を定量した。測定は Fast Garnet GBC Salt を加えた後、滅菌水 666  $\mu\text{l}$  を加え希釈して行った。

その際、550 nm では細胞のオプティカルデンシティーも測定してしまうので、550 nm での細胞のオプティカルデンシティー (O. D. 550) は別測定し、測定時に使用した O. D. 550 に相当する値を A550 の値から差し引いて補正した値を Ac550 とする。すなわち、 $\text{Ac550} = \text{A550} - \text{O. D. 550} \times \text{PIP の活性測定に使用した培養液量 (ml)}$  で計算される。ユニット値は「20 分間の測定で得られる、培養液 1 ml あたり、O. D. 600=1 あたりの Ac550 の値」とし、「 $\text{Ac550} \div \text{PIP の活性測定に使った培養液量 (ml)} \div \text{O. D. 600}$ 」で計算した。

#### 〔実施例 2〕

*R. erythropolis* に存在する新規内在性プラスミド pRE8424 の分離

本発明者は *R. erythropolis* に存在する新規内在性プラスミドを探索し、*R. erythropolis* JCM2893、*R. erythropolis* JCM2894、*R. erythropolis* DSM43200、*R. erythropolis* DSM8424 の 4 株から小型の環状プラスミドを分離し、それぞれ pRE2893、pRE2894、pRE43200、pRE8424 と名前を付けた。

これらのうち、pRE2893、pRE2894、pRE43200 の DNA 配列を一部決定したところ、本発明者が以前に *R. erythropolis* JCM2895 株から分離していた pRE2895 (参考例 1 を参照) とほぼ同一の配列を有していた。pRE2895 はプラスミドの複製に関

与する RepA、RepB タンパク質をコードする遺伝子を *RepAB* オペロンとして有しているが、これらのタンパク質は *Mycobacterium fortuitum* から分離された pAL5000 プラスミドがコードする RepA、RepB タンパク質と高度に類似しており、pRE2895 と pAL5000 が類似の様式で自律複製していることが示唆された (Stolt and Stoker, *Microbiology* 142 2795-2802 [1996], 参考例 1)。pRE2895 と pAL5000 の複製様式は明らかでないが、両プラスミドの RepA タンパク質が ColE2 プラスミドの Rep タンパク質に相同性があるため、ColE2 プラスミド同様「 $\theta$  型」の自律複製様式を有することが考えられた (Hiraga et al., *J. Bacteriol.* 176 7233-7243 [1994])。

一方、pRE8424 は pRE2895 と全く異なる DNA 配列を有していた (配列表中の配列番号 90、図 1)。このプラスミドは 6 つのオープンリーディングフレーム (ORF ; ORF1 から ORF6) を持ち、うち ORF6 がコードするタンパク質 (図 14) はローリングサークル様式で自律複製する一群のプラスミドが持つ *Rep* 遺伝子がコードするタンパク質と相同性が高かった (Khan, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61 442-455 [1997])。中でも、*Arcanobacterium pyrogenes* 由来 pAP1 (Billington et al., *J. Bacteriol.* 180 3233-3236 [1998])、*Streptomyces lividans* 由来 pIJ101 (Kendall et al., *J. Bacteriol.* 170 4634-4651 [1988])、*Streptomyces phaeochromogenes* 由来 pJV1 (Servin-Gonzalez et al., *Microbiology* 141 2499-2510 [1995])、*Brevibacterium lactofermentum* 由来 pBL1 (Fernandez-Gonzalez et al., *J. Bacteriol.* 176 3154-3161 [1994])、*Streptomyces nigrifaciens* 由来 pSN22 (Kataoka et al., *Plasmid* 32 55-69 [1994]) と相同性が高かった (図 15)。これらのプラスミドは、いずれもローリングサークル型プラスミドの中でも pIJ101/pJV1 ファミリーに属するもので (Khan, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61 442-455 [1997])、pRE8424 もこのファミリーに属するローリングサークル型プラスミドである可能性が示唆された。以下、ORF6 は *Rep* と記載する。

一般に、ローリングサークル型プラスミドが宿主細胞内で自律複製するためには、前出の *Rep* の他に、2 本鎖複製起点 (double-stranded origin ; 以下 DS0)、1 本鎖複製起点 (single-stranded origin ; 以下 SS0) となる DNA 配列が必要で

ある。本発明者は様々な pRE8424 の変異体を作成し、*R. erythropolis* を形質転換し、様々な解析を行い、DSO、SSO 配列の所在を同定した (図 1 4)。DSO は配列表中の配列番号 90 のうちヌクレオチド番号 5514 から 5970 内に存在すると考えられたが、他のローリングサークル型プラスミドの DSO 配列との比較から、配列表中の配列番号 90 のヌクレオチド番号 5705 から 5734 の配列が最も DSO の機能に重要だと考えられた (図 1 6)。また、同定した SSO 配列を図 1 7 に示す。SSO 配列は一般に、ステム - ループ構造など高度な二次構造を持ち、さらに、pIJ101/pJV1 ファミリーのプラスミドの場合、ステム - ループ構造のループ部分に TAGCGT などからなる共通配列が存在する場合が多い。pRE8424 の SSO も高度な二次構造を持ち、ループ部分に TAGCGG 配列を持つ (図 1 7)。

本発明者は、上記 TAGCGG に変異を持つ pRE8424 の派生プラスミドが *R. erythropolis* 細胞内に大量に一本鎖 DNA として蓄積していたことを見いだした。一本鎖 DNA の蓄積はローリングサークル型プラスミドのホールマークであることから (Khan, Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61 442-455 [1997])、pRE8424 はローリングサークル様式で自律複製していることが明らかとなった。

pRE8424 の派生プラスミドが宿主細胞である *R. erythropolis* 内で自律複製するためには、*Rep*、DSO、SSO を含む 2.0 kb の領域、すなわち配列表中の配列番号 90 のうちヌクレオチド番号 3845 から 5849 までの領域、で十分であった (以下の実施例 3 参照)。

図 1 4 は pRE8424 のマップを示す。図 1 4 中には主な制限酵素認識部位が示されていて、6 つの ORF が矢印で示されている。DSO と SSO の位置が四角で示されている。

図 1 5 は pRE8424、pAP1、pBL1、pJV1、pIJ101、pSN22 の Rep タンパク質の 5 カ所の保存された領域 (Motif IV、Motif I、Motif II、Motif III、C-terminal motif; Billington et al., J. Bacteriol. 180 3233-3236 [1998] 参照) のアミノ酸配列を示す。数字は各領域間に存在するアミノ酸残基の数、即ちギャップのアミノ酸残基の数を示す。完全に保存されたアミノ酸残基は星 (\*)、高度に保存された領域は 2 つの点 (:), 比較的保存された領域は 1 つの点 (.) で示した。Rep タンパク質の機能に重要とされるチロシン残基は四角で囲ってある。

図 1 6 は pRE8424、pAP1、pBL1、pJV1、pIJ101、pSN22 の DSO と考えられる配列のうち、特に保存された DNA 部分を示す。更に DSO の機能に特に重要な GG ジヌクレオチドは下線を引いてある (Billington et al., J. Bacteriol. 180 3233-3236 [1998] 参照)。

図 1 7 は pRE8424 の SS0、即ち配列表中の配列番号 9 0 のうちヌクレオチド番号 5268 から 5538 の配列と、その取りうる二次構造を示した。二次構造の予測は mfold program, version 3.0 (Michael Zuker, Washington University, St. Louis, Mo.; <http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/old/dna/form1.cgi>) によって行った。上述の TAGCGG 配列を黒丸で示した。

#### 〔実施例 3〕

##### pHN372 の構築

pRE8424 の自律複製に必須な 2.0 kb の領域には、不必要な制限酵素認識部位 *Bam*HI が存在していたので、これを除去する作業を以下のように行った。

pRE8424 をテンプレートとし、配列表中の配列番号 5 7 (sHN389)、5 8 (sHN390) に記載の合成オリゴデオキシリボヌクレオチドプライマー（以下プライマーと略記）を用いて、PCR による DNA の増幅を行った。得られた 1.0 kb の断片は *Rep* の 5' 末端側の一部を含む。この断片の 5' 末端をリン酸化し、pBluescript II SK (+) (STRATAGENE 社製) の *Hinc*II 部位に導入し、できたプラスミドに pHN371 と名前を付けた。pRE8424 をテンプレートとし、配列表中の配列番号 5 9 (sHN391)、6 0 (sHN321) に記載のプライマーを用いて、PCR による DNA の増幅を行った。得られた 1.0 kb の断片は *Rep* の 3' 末端側の一部を含む。この断片を *Bam*HI で消化した後、5' 末端をリン酸化し、pHN371 の *Eco*RV / *Bgl*II 部位に導入した。できたプラスミドに pHN372 と名前を付けた。pHN372 は、pRE8424 の自律複製に必須な 2.0 kb の領域を持ち、かつ、pRE8424 には存在した *Bam*HI 部位は除去されている。また、*Bam*HI 部位の除去は、pRE8424 の自律複製の機能には影響しなかった。

#### 〔実施例 4〕

##### pHN346 の構築

*Rhodococcus* 属細菌の形質転換体選択マーカーとして、参考例に示すベクターの構築においてはテトラサイクリン耐性遺伝子のみ開発していたが、複数のプラ

スミドで形質転換するためには、別の抗生物質に対する耐性遺伝子を新規に開発する必要がある。本発明者は、*R. erythropolis* DSM 313 株がクロラムフェニコールに対して耐性を有していることを見だし、耐性を付与している遺伝子を分離することとした。*Rhodococcus* 属細菌からは、すでに2つのクロラムフェニコール耐性遺伝子が分離されており (*cmrA* 遺伝子、ならびに *cmr* 遺伝子)、これらの遺伝子は互いに高い相同性を有している (De Mot et al., *Microbiology* 143 3137-3147 [1997]、Desomer et al., *Mol. Microbiol.* 6 2377-2385 [1992])。

*R. erythropolis* DSM 313 株のクロラムフェニコール耐性遺伝子もこれらに相同であることが予想されたので、*R. erythropolis* DSM 313 株ゲノム DNA をテンプレートとし、配列表中の配列番号 6 1 (sHN335)、6 2 (sHN336) に記載のプライマーを用いて、PCR による DNA の増幅を行った。なお、該プライマーは *cmrA* 遺伝子と *cmr* 遺伝子において最も相同性が高かった配列をもとにデザインした。その結果、0.7 kb の増幅されたバンドが確認された。この PCR 産物の DNA 配列を決定したところ、*cmrA* 遺伝子に極めて高い相同性を有していた。決定された配列を元に、配列表中の配列番号 6 3 (sHN349)、6 4 (sHN351) に記載のプライマーを設計し、インバース PCR (Ochman et al., *Genetics* 120 621-623 [1988]) にて *R. erythropolis* DSM 313 株のクロラムフェニコール耐性遺伝子の全長を分離した。テンプレートとして用いた DNA は *R. erythropolis* DSM313 株のゲノム DNA 0.1  $\mu$ g を *Sa*II で切断し、リガーゼにより自己閉環化したものである。得られた PCR 産物は 2.3 kb で、この断片の全 DNA 配列を決定した。この断片中には1つの ORF が存在し、この遺伝子に *ChlA* と名前を付けた (図中では *ChlA* と表記)。

*R. erythropolis* DSM 313 株ゲノム DNA をテンプレートとし、配列表中の配列番号 6 5 (sHN361)、6 6 (sHN362) に記載のプライマーを用いて、PCR による DNA の増幅を行った。得られた 0.5 kb の断片はクロラムフェニコール耐性遺伝子の 5' 末端部分を含む。この断片を *Sac*I で消化し、その 5' 末端をリン酸化した。一方、*R. erythropolis* DSM 313 株ゲノム DNA をテンプレートとし、配列表中の配列番号 6 7 (sHN363)、6 8 (sHN364) に記載のプライマーを用いて、PCR による DNA の増幅を行った。得られた 1.3 kb の断片はクロラムフェニコール耐性遺伝子の 3' 末端部分を含む。この断片を *Spe*I で消化し、その 5' 末端をリン酸化した。

これら2つのDNA断片を同時に pBluescript II SK (+) の *SacI* / *SpeI* 部位に導入し、できたプラスミドに pHN346 と名前を付けた。pHN346 は全長のクロラムフェニコール耐性遺伝子を含むが、該 ORF 中にもともと存在していた *EcoRI* 部位が除かれている（ただし、コードするタンパク質のアミノ酸配列は変化しない）。

#### 〔実施例5〕

Proline iminopeptidase (PIP) をレポーター遺伝子として有する誘導型発現ベクターの構築；pHN171、pHN379、pHN348、pHN380 の構築

pHN346（実施例4）から 1.8 kb のクロラムフェニコール耐性遺伝子を含む断片を *XbaI* と *SpeI* で切り出し、pHN154（特願 2002-235008）の *XbaI* 部位に導入した。この結果できたプラスミドに pHN347 と名前を付けた。pHN171（参考例を参照）から 1.1 kb の断片を *BsrGI* と *SpeI* で切り出し、pHN347 の *BsrGI* / *SpeI* 部位に導入した。出来たプラスミドに pHN348 と名前を付けた。

pHN171 も pHN348 も pTip ベクター（参考例を参照）の MCS にレポーター遺伝子、PIP が導入された発現ベクターであるが、pHN171 がテトラサイクリン耐性遺伝子を形質転換マーカーとして持つのに対して、pHN348 がクロラムフェニコール耐性遺伝子を持っていることのみが異なる。また、いずれのプラスミドも *TipA* 遺伝子プロモーターの下流に元来存在していたリボソーム結合部位配列（*TipA*-RBS）は翻訳効率の良い、バクテリオファージ gene 10 由来のリボソーム結合部位配列に変更されている（*TipA-LG10* プロモーター；参考例を参照）。PIP の C の末端側には、タンパク質の精製を容易にするために 6×His タグが付くように設計されている。6×His タグは、6つの連続したヒスチジン残基から成る連続配列で、これを融合したタンパク質は、ニッケルイオン等に高い親和性を示すようになる。従って、ニッケルイオン等を用いた金属キレートクロマトグラフィーで精製が容易になる（Crowe et al., Methods Mol. Biol. 31 371-387 [1994]）。

上述の pHN171 と pHN348 の DNA 配列のうち、pRE2895 に由来するプラスミドの自律複製に必須な 1.9 kb の領域を、pRE8424 に由来するプラスミドの自律複製に必須な 2.0 kb の領域に変更するために以下の作業を行った。

pHN171 をテンプレートとし、配列表中の配列番号 69 (sHN368)、70 (sHN373) に記載のプライマーを用いて、PCR による DNA の増幅を行った。得られた 0.2 kb

の断片はチオストレプトン耐性遺伝子(*tsr* 遺伝子; 図中では Thior と表記) (Bibb et al., Mol. Gen. Genet. 199 26-36 [1985]) の 5' 末端部分を含む。この断片を *Bsr*GI と *Cla*I で消化し、pHN171 と pHN348 の *Bsr*GI / *Cla*I 部位にそれぞれ導入した。この結果出来たプラスミドにそれぞれ pHN357 と pHN358 と名前を付けた。pHN372 (実施例 3) から 2.0 kb の pRE8424 に由来するプラスミドの自律複製に必要な領域を含む断片を *Bsr*GI と *Hpa*I で切り出し、pHN357 と pHN358 の *Bsr*GI / *Hpa*I 部位にそれぞれ導入した。この結果できたプラスミドに pHN379、pHN380 とそれぞれ名前を付けた。

#### 〔実施例 6〕

##### pTip ベクターの構築

pHN171、pHN348、pHN379、pHN380 (実施例 5) の PIP 遺伝子の代わりに、MCS を導入し、8 種類の pTip ベクターを構築した過程を示す。なお、今回作成した、pTip ベクターのうち、4 つ (pTip-RT1、pTip-RT2、pTip-RC1、pTip-RC2 ; 後述) は、参考例 1 に記載の pTip ベクターとは、*Rhodococcus* 属細菌でプラスミドが自律複製するのに必要な DNA 領域が異なり、参考例 1 に記載の pTip ベクター全てと *Rhodococcus* 属細菌内での不和合性を起こさない (後述)。また、残りの 4 つ (pTip-QT1、pTip-QT2、pTip-QC1、pTip-QC2 ; 後述) は、参考例 1 に記載の pTip ベクターとは MCS の配列が一部異なっている。

配列表中の配列番号 7 1、7 2 に記載の合成オリゴデオキシリボヌクレオチドは MCS 部位になる配列を含み、お互いに相補的な配列を持つ。これら 2 つを等モル量ずつ混合し、70 °C で 10 分処理し、20 分かけて室温に冷却し、2 本鎖化させた (MCS type 1)。その結果、その末端は *Nco*I と *Spe*I で二重消化されたベクターと連結可能な状態になり、この 2 本鎖化した合成 DNA を pHN379、pHN380 の *Nco*I / *Spe*I 部位にそれぞれサブクローンした。その結果できたプラスミドに pTip-RT1、pTip-RC1 とそれぞれ名前をつけた。配列表中の配列番号 7 3、7 4 に記載の合成オリゴデオキシリボヌクレオチドを同様に 2 本鎖化させ (MCS type 2)、一方、pTip-LNH2 (参考例 1 を参照) から 0.2 kb の *TipA* 遺伝子プロモーターと LG10-RBS を含む断片を *Bsr*GI と *Nde*I で切り出した。これら 2 つの DNA 断片を同時に、pHN379 と pHN380 の *Bsr*GI / *Spe*I 部位にそれぞれ導入した。この結果できたプラスミド

に pTip-RT2、pTip-RC2 と名前を付けた。pTip-RT1 から 0.3 kb の *TipA* 遺伝子プロモーター、LG10-RBS、MCS type 1 を含む断片を *Bsr*GI と *Spe*I で切り出し、pHN171 と pHN348 の *Bsr*GI / *Spe*I 部位にそれぞれ導入した。この結果できたプラスミドに pTip-QT1、pTip-QC1 と名前を付けた。pTip-RT2 から 0.3 kb の *TipA* 遺伝子プロモーター、LG10-RBS、MCS type 2 を含む断片を *Bsr*GI と *Spe*I で切り出し、pHN171 と pHN348 の *Bsr*GI / *Spe*I 部位にそれぞれ導入した。この結果できたプラスミドに pTip-QT2、pTip-QC2 と名前を付けた。

図 18-1 に pTip ベクター(pTip-QT1、pTip-QT2、pTip-RT1、pTip-RT2、pTip-QC1、pTip-QC2、pTip-RC1、pTip-RC2) のマップを示す。該図中、Thior はチオストレプトン耐性遺伝子を、Tuf1p は Tuf1 遺伝子プロモーターを、Tetr はテトラサイクリン耐性遺伝子を、Chlr はクロラムフェニコール耐性遺伝子を (各 pTip-ベクターは Tuf1p-Tetr または Chlr いずれか一つを持つ)、ALDHp は *TipA* 遺伝子 (*TipA*) を転写せしめる *ThcA* プロモーターを、Ampr はアンピシリン耐性遺伝子を、ColE1 は大腸菌の複製起点を、ALDht は *ThcA* 遺伝子転写終結配列を、MCS はマルチクローニング部位を (各 pTip-ベクターは MCS type1 または MCS type 2 のいずれか一つを持つ)、TipAp は *TipA* 遺伝子プロモーターを、TipA-LG10p は *TipA*-LG10 プロモーターを、*RepA&B* は pRE2895 由来のプラスミドの *R. erythropolis* 内での自律複製に必須な領域を、*Rep* は pRE8424 由来のプラスミドの *R. erythropolis* 内での自律複製に必須な領域を (各 pTip-ベクターは *RepA&B* または *Rep* のいずれか一つを持つ) 示す。なお、実施例 9 に書かれた pNit ベクター (後述) の図が該図、右半分に記してあり、記号などは上記のものと同一である。

図 20 は、*TipA*-LG10 プロモーター - MCS - *ThcA* 遺伝子ターミネーターの DNA 配列を示す。該図中、実線の矢印は *TipA* 遺伝子プロモーター中に存在する Inverted repeat 配列を示す。斜線の矢印は *ThcA* 遺伝子転写終結配列に存在する Inverted repeat 配列を示す。また、原核生物のプロモーター領域に一般的に存在し、遺伝子の転写に重要な -10 領域、-35 領域は四角で囲んである。また、四角で囲まれた TATAAT 配列は *TipA* 遺伝子プロモーターから *Nit* プロモーターを作成したときに導入した変異を示す (実施例 7 に詳述)。

〔実施例 7〕



### pHN231 の構築

まず本発明者は、*TipA* 遺伝子プロモーターに変異を導入して、誘導型から構成型プロモーターに改変することとした。*TipA* 遺伝子プロモーター配列中の「Inverted repeat」領域にチオストレプトン - *TipA* タンパク質複合体が結合し、自らの遺伝子の転写を促進することは以前から知られていた (Holmes et al., EMBO J. 12 3183-3191 [1993])。そこで、本発明者は該 DNA 領域に、inverted repeat 構造を破壊する変異を導入したら、*TipA* 遺伝子プロモーターの転写活性に何らかの変化が現れるのではないかと考え、様々な *TipA* 遺伝子プロモーター変異体を作成した。それらのうち、*TipA* 遺伝子プロモーターの所謂-10 領域 (Fenton and Gralla, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98 9020-9025 [2001]) に変異を導入したもの (図 19 ; CAGCGT から TATAAT への変異) では、チオストレプトン非存在下でも、レポーター遺伝子の発現が観察された (図 20 ; 実施例 10 に詳述)。なお、この TATAAT からなる DNA 配列は、大腸菌において非常に強力なプロモーターとして機能する DNA 配列中の-10 領域によく見られる配列である。以上のことからこの変異 *TipA* 遺伝子プロモーターは構成型プロモーターであると結論された。また、この構成型プロモーターに *Nit* (Non-Inducible *TipA* ; 図中では *Nitp* と表記) プロモーターと名前を付けた。

*Nit* プロモーターを構築した過程を以下に示す。pHN150u (参考例 1 を参照) をテンプレートとし、配列表中の配列番号 75 (sHN217)、76 (sHN218) に記載のプライマーを用いてインバース PCR にて DNA の増幅を行った。なお、pHN150u は、p Bluescript II SK (+) の MCS に、野生型 *TipA* 遺伝子プロモーターがクローン化されたプラスミドで、また上記 2 つのプライマーはその 5' 末端がそれぞれリン酸化されている。このインバース PCR 断片をリガーゼ反応により自己閉環化し、結果出来たプラスミドに pHN231 と名前を付けた。pHN231 は *Nit* プロモーターが p Bluescript II SK (+) の MCS にクローン化された形になっている。

### 〔実施例 8〕

PIP をレポーター遺伝子として有する構成型発現ベクターの構築 ; pHN407、pHN385、pHN409、pHN389 の構築

pTip-NH1 (参考例 1 を参照) をテンプレートとし、配列表中の配列番号 77

(sHN395)、78 (sHN396) に記載のプライマーを用いて、PCR による DNA の増幅を行った。得られた 1.6 kb の断片はテトラサイクリン耐性遺伝子を含む。この断片を *HpaI* と *KpnI* で消化し、pHN379 (実施例 5) の *HpaI* / *KpnI* 部位に導入した。この結果出来たプラスミドに pHN381 と名前を付けた。pHN346 (実施例 4) をテンプレートとし、配列表中の配列番号 79 (sHN397)、80 (sHN398) に記載のプライマーを用いて、PCR による DNA の増幅を行った。得られた 1.8 kb の断片はクロラムフェニコール耐性遺伝子を含む。この断片を *HpaI* と *KpnI* で消化し、pHN380 (実施例 5) の *HpaI* / *KpnI* 部位に導入した。この結果出来たプラスミドにそれぞれ pHN382 と名前を付けた。pHN231 (実施例 7) から 0.2 kb の *Nit* プロモーターを含む断片を *BsrGI* と *NcoI* で切り出し、pHN381 と pHN382 の *BsrGI* / *NcoI* 部位にそれぞれ導入した。この結果できたプラスミドに pHN383、pHN387 とそれぞれ名前を付けた。pHN231 (実施例 7) をテンプレートとし、配列表中の配列番号 81 (sHN147)、82 (sHN376) に記載のプライマーを用いて、PCR による DNA の増幅を行った。

得られた 0.2 kb の断片は *Nit* プロモーターのうち RBS 部分は含んでいない。この断片を *BsrGI* と *XbaI* で消化し、pHN381 と pHN382 の *BsrGI* / *XbaI* 部位にそれぞれ導入した。この結果出来たプラスミドに pHN385、pHN389 とそれぞれ名前を付けた。また、この *Nit* プロモーター (RBS 部分除く) - LG10RBS のハイブリッド DNA を *Nit*-LG10 プロモーターとする。pHN171 をテンプレートとし、配列表中の配列番号 83 (sHN388)、84 (sHN120) に記載のプライマーを用いて、PCR による DNA の増幅を行った。得られた 1.9 kb の断片は pRE2895 由来の *RepAB* オペロンを含む。この断片を *BsrGI* と *HpaI* で消化し、pHN387 と pHN389 の *BsrGI* / *HpaI* 部位にそれぞれ導入した。この結果出来たプラスミドに pHN407、pHN409 とそれぞれ名前を付けた。

またコントロール実験用プラスミドとして、pHN387 から、0.2 kb の *Nit* プロモーターを *BsrGI* と *NcoI* で切り出した。この DNA 断片を pHN380 (実施例 5) の *BsrGI* / *NcoI* 部位に導入した。この結果できたプラスミドに pHN410 と名前を付けた。

〔実施例 9〕

pNit ベクターの構築

pHN407、pHN385、pHN409、pHN389（実施例 8）の PIP 遺伝子の代わりに、MCS を導入し、8 種類の pNit ベクターを構築した過程を示す。

pTip-RT1（実施例 6）から 2.2 kb の断片を *NcoI* と *KpnI* で切り出し、pHN407、pHN385、pHN409、pHN389 の *NcoI* / *KpnI* 部位にそれぞれ導入した。この結果できたプラスミドに pNit-QT1、pNit-RT1、pNit-QC1、pNit-RC1 とそれぞれ名前を付けた。pHN385（実施例 8）をテンプレートとし、配列表中の配列番号 81（sHN147）、85（sHN160）に記載のプライマーを用いて、PCR による DNA の増幅を行った。得られた 0.2 kb の断片は *Nit-LG10* プロモーターを含む。この断片を *BsrGI* と *NdeI* で消化した。一方、pTip-RT2（実施例 6）から、2.0 kb の MCS type 2、アンピシリン耐性遺伝子、*ColE1* を含む断片を *NdeI* と *KpnI* で切り出した。上記 2 つの DNA 断片を同時に、pHN407、pHN385、pHN409、pHN389（実施例 8）の *BsrGI* / *KpnI* 部位にそれぞれ導入した。この結果できたプラスミドに pNit-QT2、pNit-RT2、pNit-QC2、pNit-RC2 とそれぞれ名前を付けた。

図 18-2 に pNit ベクター（pNit-QT1、pNit-QT2、pNit-RT1、pNit-RT2、pNit-QC1、pNit-QC2、pNit-RC1、pNit-RC2）のマップを示す。略号等は実施例 6 に記された通りである。

#### 〔実施例 10〕

*TipA* 遺伝子プロモーター、*Nit* プロモーターからの PIP の発現 pHN380、pHN410、pHN381、pHN387、pHN389 を用いて、pTip、pNit ベクター群からの遺伝子発現様式を観察した。以下に、その過程と結果を示す。

まず、*R. erythropolis* JCM3201 株を pHN380、pHN410、pHN381、pHN387、pHN389 で、形質転換した。これら形質転換体を用いて PIP のペプチダーゼ活性を測定した。結果を図 20 に示す。

図 20 中、形質転換に用いたプラスミドの名前とそれぞれの簡単な特徴が示されており、黒いバーはチオストレプトンで該形質転換体を処理したとき、網掛けのバーはチオストレプトンで該形質転換体を処理しなかったときの PIP のペプチダーゼ活性を示す。pHN380（*TipA-LG10* プロモーター - PIP からなる遺伝子カセットを pTip ベクターの骨格に持つ）での形質転換体はチオストレプトンによる遺伝子発現制御が働いているが、pHN410（*Nit* プロモーター - PIP からなる遺伝子カ

セットを pTip ベクターの骨格中に持つ)での形質転換体はチオストレプトンによる遺伝子発現制御が働いていない。また、pHN387 は pHN410 からチオストレプトン耐性遺伝子と、*ThcA* 遺伝子プロモーター - *TipA* 遺伝子からなる遺伝子カセットを取り除いた形のプラスミドであるが、このプラスミドでの形質転換体もチオストレプトンがなくても、PIP が発現していた。つまり、TipA タンパク質がなくても、*Nit* プロモーターからの遺伝子発現がおこることを意味する。pHN387、pHN389 による形質転換体を用いた結果から、RBS の配列はチオストレプトンによる遺伝子発現制御には関係ないことが示唆された。pHN381 は pHN389 の *Nit-LG10* プロモーターを *TipA-LG10* プロモーターに置換したものであるが、pHN381 での形質転換体では PIP の発現は構成的になっていない。以上のことから、*Nit* プロモーター、*Nit-LG10* プロモーターが構成型のプロモーターで、その発現に TipA タンパク質を必要としないことがわかる。

なお、pTip、pNit ベクターからの PIP の発現は 30 °C ばかりでなく、4 °C でも可能であったことを確認した。

#### [実施例 11]

pRE2895、pRE8424 由来プラスミドの自律複製に必須な領域の比較

pTip ベクターと pNit ベクター群を用いて、pRE2895、pRE8424 由来プラスミドの自律複製に必須な領域の特徴を調べた。

まず、pNit-QC2 と pNit-RC2 の *R. erythropolis* JCM 3201, *R. fascians* JCM10002, *R. opacus* DSM44193, *R. ruber* JCM3205 および *R. rhodochrous* JCM3202 に対する形質転換効率を調べた。結果を表 3 に示す。表 3 では各 1 µg のプラスミド DNA を用いて形質転換した時に、クロラムフェニコールを含む固体培地上に出現したコロニー数を示す。この結果から、*R. erythropolis* JCM 3201, *R. fascians* JCM10002, *R. opacus* DSM44193 では、効率の差はあるものの、pNit-QC2 と pNit-RC2、いずれでも形質転換が可能であることがわかった。なお、*R. ruber* JCM3205、*R. rhodochrous* JCM3202 では形質転換体は得られなかった。

次に pHN409 と pHN389 (実施例 9) で *R. erythropolis* JCM 3201, *R. fascians* JCM10002, *R. opacus* DSM44193 を形質転換した。なお、pHN409 と pHN389 の違いは自律複製に必須な領域が pRE2895 に由来するか pRE8424 に由来するか、だけで

ある。*R. erythropolis* JCM3201 において、pHN409 で形質転換した細胞と、pHN389 で形質転換した細胞とで、PIP ペプチダーゼ活性を比較したところ、ほとんど差がないか、若干 pHN409 で形質転換した細胞の方が高かった。この結果は、*R. fascians* JCM10002、*R. opacus* DSM44193 を宿主とした場合でもほぼ同様であった。また、*R. erythropolis* JCM3201 での PIP ペプチダーゼ活性よりも *R. fascians* JCM10002、*R. opacus* DSM44193 での PIP ペプチダーゼ活性の方がいずれのプラスミドを用いた場合でも低かった。

次に pNit-QC2 と pNit-RC2 の *R. erythropolis* JCM 3201 細胞内でのプラスミドコピー数を調べた。実験手法は Projan らの方法 (Projan et al., Plasmid 9 182-190 [1983]) に従った。この方法でプラスミドコピー数を計算するためには *R. erythropolis* JCM 3201 のゲノムサイズを知る必要があるが、van der Geize らによれば、*R. erythropolis* ATCC4277 株から派生した株、*R. erythropolis* RG1 株のゲノムサイズが 6 メガベースペア (Mbp) であり、かつ、*R. erythropolis* ATCC4277 株と *R. erythropolis* JCM 3201 株がほぼ同等の菌株であることから、*R. erythropolis* JCM 3201 株のゲノムサイズも 6 Mbp として計算した。結果は、pNit-QC2 が、 $47 \pm 5$ 、pNit-RC2 が、 $64 \pm 5$  のコピー数であった。

#### 〔実施例 12〕

##### プラスミド不和合性

細菌では一般に、同一の複製起点を持つ異種プラスミドは細胞内に共存できないことが多い。これはプラスミド不和合性 (plasmid incompatibility) と呼ばれる現象によるもので (Novick, Microbiol. Rev. 51 381-395 [1987])、*Rhodococcus* 属細菌と近縁の *Mycobacterium* 属でも報告されている (Stolt and Stoker, Microbiology 142 2795-2802 [1996])。本発明者は、配列の異なる 2 つの *R. erythropolis* 内在性プラスミドを分離したことから (pRE2895 と pRE8424)、複数のプラスミドを単一細胞内に共存させ、組換えタンパク質生産に利用できると考えた。そこで、まず、pTip-、pNit-ベクター群のプラスミド不和合性について調べた。

*R. erythropolis* JCM 3201 に対して、pNit-QC2 または pNit-RC2 で第一の形質転換を行い、さらに、これらの形質転換体細胞に対して pNit-QT2 または pNit-RT2

で第二の形質転換を行った。第二の形質転換後は、テトラサイクリンのみを含む LB 固体培地で形質転換体を選択した。結果を表 4 に示す。表 4 中、右から二番目のカラムは、各 1  $\mu$ g のプラスミド DNA を用いて第二の形質転換した時に、テトラサイクリンを含む固体培地上に出現したコロニー数を示す。一番右のカラムは、第二の形質転換後に、第一の形質転換に用いたプラスミドが残っていたコロニーの確率(%)、即ち、第二の形質転換後にテトラサイクリン耐性だったコロニーの出現率を示す。その際、調べたコロニー数は各 20 コロニー ( $n=20$ ) である。表 4 に示されたように、同じ複製起点を持つ 2 つのプラスミドを用いた場合、第二の形質転換効率が極端に低下したこと、第二の形質転換後に第一の形質転換プラスミドが高頻度に消失していることから、不和合性を引き起こしたといえる。それに対して、別種の複製起点を持つ 2 つのプラスミドでは、第二の形質転換効率が低下しなかったこと、第二の形質転換後にも第一の形質転換プラスミドが安定に存在していることから不和合性を起こさなかったことが示唆された。つまり、pRE2895 から派生したプラスミドと、pRE8424 から派生したプラスミドは完全に「compatible」であるといえる。

#### 〔実施例 13〕

##### 組換えタンパク質の単一細胞内での共発現

実施例 12 に書かれたように pRE2895 から派生したプラスミドと、pRE8424 から派生したプラスミドは完全に compatible で、一つの *R. erythropolis* 細胞内に共存可能であった。このことを利用して、PIP と GFP の単一細胞内での共発現を試みた。

まず、pHN187 (参考例 1 を参照) をテンプレートとし、配列表中の配列番号 86 (sHN337)、87 (sHN338) に記載のプライマーを用いて、PCR による DNA の増幅を行った。得られた 0.2 kb の断片は GFP 遺伝子の 5' 末端側を含む。この断片を *Nco*I で消化し、この断片の 5' 末端をリン酸化した。一方、pHN187 をテンプレートとし、配列表中の配列番号 88 (sHN339)、89 (sHN340) に記載のプライマーを用いて、PCR による DNA の増幅を行った。得られた 0.5 kb の断片は GFP 遺伝子の 3' 末端側を含む。この断片を *Bgl*II で消化し、その 5' 末端をリン酸化した。これら 2 つの DNA 断片を同時に pNit-QT1 と pNit-RT1 の *Nco*I / *Bgl*II 部位にそれ

ぞれ導入し、できたプラスミドにそれぞれ pHN425、pHN426 と名前を付けた。pHN425、pHN426 は全長の GFP 遺伝子含み、GFP の C 末端側に 6×His タグが付加されるような配列が融合されている。また、GFP 遺伝子内部に存在していた *NcoI* 部位は上記作業中に除かれているが、GFP の機能に変化はない。

pHN425 と pHN389 で、*R. erythropolis* JCM3201 を共形質転換し、形質転換体をテトラサイクリンとクロラムフェニコール両方を含む培地で選択した。また、pHN426 と pHN409 で、*R. erythropolis* JCM3201 を形質転換し、共形質転換体をテトラサイクリンとクロラムフェニコール両方を含む培地で選択した。また、対照実験として、pHN425、pHN426、pHN389、pHN409 で *R. erythropolis* JCM3201 をそれぞれ形質転換した。これら 6 種類の形質転換体を実施例 1 に記載されたようにして PIP と GFP を発現させ、ニッケルイオンを用いた金属キレートクロマトグラフィーで精製した。組換えタンパク質の精製、精製前並びに精製後のサンプルの SDS ポリアクリルアミド電気泳動は以下の方法で行った。PIP の C 末端には 6×His タグがついており、Ni-NTA Superflow (Qiagen 社製) を用いて、その使用説明書に準じて精製を行った。

以下に具体的な精製法を示すが、精製の作業は 4 °C で行った。タンパク質を発現させた菌体 (20 ml 培養液分) を回収し、1 ml の NT-Buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、100 mM 塩化ナトリウム、1 mM ジチオスレイトール) に懸濁し、1 g のガラスビーズ(直径 0.105-0.125 ミリメートル)を加えた。これを Fast-prep FP120 (SAVANT 社製) にて 6 m/秒の速度、20 秒間往復振とう運動させることで、細胞を破壊した。20,000×g にて遠心し、その上清 700 μl に、予め NT-Buffer で平衡化された Ni-NTA Superflow をベッド体積 40 μl になるように加えた。これを 1 時間回転攪拌しながら Ni-NTA Superflow ビーズと 6×His タグのついたタンパク質とを結合させた。このビーズを NT-Buffer で 4 回洗浄した後、120 μl の NTE-Buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.0)、100 mM 塩化ナトリウム、1 mM ジチオスレイトール、400 mM イミダゾール) に 3 回懸濁することで、ビーズから 6×His タグのついたタンパク質を溶出させた。上記サンプルのうち 10 μl を常法に従い、12% SDS ポリアクリルアミド電気泳動に供した。SDS ポリアクリルアミド電気泳動結果後、ゲルをクマシーブリリアントグリーン G-250 で染色した結果を図 2 1 に

示した。

図 2 1 中、奇数番号のレーンは細胞の粗抽出液（即ち、精製前のサンプル）、偶数番号のレーンは金属キレートクロマトグラフィーで精製した後のサンプルを示す。また、レーン 1, 2 は pHN425 と pHN389 で共形質転換した *R. erythropolis* JCM3201 からのサンプル、レーン 3, 4 は pHN426 と pHN409 で共形質転換した細胞からのサンプル、レーン 5, 6 は pHN425 で形質転換した細胞からのサンプル、レーン 7, 8 は pHN426 で形質転換した細胞からのサンプル、レーン 9, 10 は pHN389 で形質転換した細胞からのサンプル、レーン 11, 12 は pHN409 で形質転換した細胞からのサンプルである。

図 2 1 のレーン 2 と 4 に 2 本のバンドが見られることから、PIP、GFP が、単一の細胞内で共発現され、精製されたことが示された。また、共発現させたとき（レーン 2, 4）と、それぞれ単独で発現させたとき（レーン 6, 8, 10, 12）の PIP、GFP の発現量に大きな差異は見られなかった。

表 1 に実施例で用いた各プラスミドのリストを、表 2 に実施例で用いた菌株のリストを、表 3 に pNit-QC2 と pNit-RC2 の *R. erythropolis* JCM 3201, *R. fascians* JCM10002, *R. opacus* DSM44193 に対する形質転換効率を、表 4 に pNit-QC2、pNit-RC2、pNit-QT2、pNit-RT2 による *R. erythropolis* JCM 3201 への共形質転換の結果を示す。



表 1

表1 本発明に用いた主なプラスミド

分類	プラスミド名	備考	ソース
Cryptic plasmids of <i>R. erythropolis</i>	pRE2895	Source of <i>RepAB</i> (cryptic plasmid isolated from <i>R. erythropolis</i> JCM2895)	特願 2002-235008
	pRE8424	Source of <i>Rep</i> (cryptic plasmid isolated from <i>R. erythropolis</i> DSM8424)	This study
	PRE2893	Cryptic plasmid isolated from <i>R. erythropolis</i> JCM2893	This study
	PRE2894	Cryptic plasmid isolated from <i>R. erythropolis</i> JCM2894	This study
	PRE43200	Cryptic plasmid isolated from <i>R. erythropolis</i> DSM43200	This study
For identification of DSO and SSO of pRE8424	pHN267	<i>Kan<sup>r</sup></i> on pGEM 3Zf(+)	This study
	pHN317	<i>Rep</i> , DSO, IR I, IR II (SSO) on pHN267	This study
	pHN345	<i>Rep</i> , DSO, mutated IR I, IR II (SSO) on pHN267	This study
	pHN362	<i>Rep</i> , DSO, IR I, mutated IR II on pHN267	This study
	pHN363	<i>Rep</i> , DSO, mutated IR I, mutated IR II on pHN267	This study
	pHN322	<i>Rep</i> , DSO, IR I, IR II (SSO) on pHN267	This study
	pHN343	<i>Rep</i> , DSO, IR II (SSO) on pHN267	This study
	pHN344	<i>Rep</i> , DSO, IR I, IR II (SSO) on pHN267	This study
	pHN324	<i>Rep</i> , IR I, IR II (SSO) on pHN267	This study
Source of <i>Rep</i> region for pTip- and pNit- vectors	pHN372	2.0-kb region originating from pRE8424 on pBluescript SK (+), <i>Bam</i> HI site is eliminated	This study
pTip-vectors	pTip-QT1	<i>P<sub>TipA</sub></i> , <i>Tet<sup>r</sup></i> , <i>RepAB</i> (pRE2895), MCS type 1	This study
	pTip-QT2	<i>P<sub>TipA</sub></i> , <i>Tet<sup>r</sup></i> , <i>RepAB</i> (pRE2895), MCS type 2	This study
	pTip-RT1	<i>P<sub>TipA</sub></i> , <i>Tet<sup>r</sup></i> , <i>Rep</i> (pRE8424), MCS type 1	This study
	pTip-RT2	<i>P<sub>TipA</sub></i> , <i>Tet<sup>r</sup></i> , <i>Rep</i> (pRE8424), MCS type 2	This study
	pTip-QC1	<i>P<sub>TipA</sub></i> , <i>Chl<sup>r</sup></i> , <i>RepAB</i> (pRE2895), MCS type 1	This study
	pTip-QC2	<i>P<sub>TipA</sub></i> , <i>Chl<sup>r</sup></i> , <i>RepAB</i> (pRE2895), MCS type 2	This study

	pTip-RC1	$P_{TipA}$ , $Chl^f$ , $Rep$ (pRE8424), MCS type 1	This study
	pTip-RC2	$P_{TipA}$ , $Chl^f$ , $Rep$ (pRE8424), MCS type 2	This study
<hr/>			
pNit-vectors	pNit-QT1	$P_{Nit}$ $Tet^f$ , $RepAB$ (pRE2895), MCS type 1	This study
	pNit-QT2	$P_{Nit}$ $Tet^f$ , $RepAB$ (pRE2895), MCS type 2	This study
	pNit-RT1	$P_{Nit}$ $Tet^f$ , $Rep$ (pRE8424), MCS type 1	This study
	pNit-RT2	$P_{Nit}$ $Tet^f$ , $Rep$ (pRE8424), MCS type 2	This study
	pNit-QC1	$P_{Nit}$ $Chl^f$ , $RepAB$ (pRE2895), MCS type 1	This study
	pNit-QC2	$P_{Nit}$ $Chl^f$ , $RepAB$ (pRE2895), MCS type 2	This study
	pNit-RC1	$P_{Nit}$ $Chl^f$ , $Rep$ (pRE8424), MCS type 1	This study
	pNit-RC2	$P_{Nit}$ $Chl^f$ , $Rep$ (pRE8424), MCS type 2	This study
<hr/>			
PIP expression	pHN171	6xHis-PIP in MCS of pTip-LCH1	特願 2002-235008
vectors	pHN379	6xHis-PIP in MCS of pTip-RT1	This study
	pHN348	6xHis-PIP in MCS of pTip-QC1	This study
	pHN380	6xHis-PIP in MCS of pTip-RC1	This study
	pHN407	6xHis-PIP in MCS of pNit-QT1	This study
	pHN385	6xHis-PIP in MCS of pNit-RT1	This study
	pHN409	6xHis-PIP in MCS of pNit-QC1	This study
	pHN389	6xHis-PIP in MCS of pNit-RC1	This study
	pHN410	$P_{TipA}$ and LG10-RBS of pHN380 were substituted into $P_{Nit}$ and wild-type TipA-RBS, respectively	This study
	pHN387	LG10-RBS of pHN389 was substituted into wild-type RBS of TipA-RBS	This study
	pHN381	$P_{Nit}$ of pHN389 was substituted into $P_{TipA}$	This study
<hr/>			
GFP expression	pHN425	6xHis-GFP in MCS of pTip-QT1	This study
vectors	pHN426	6xHis-GFP in MCS of pTip-RT1	This study
<hr/>			

表 2

本発明に用いた主な菌株

属、種	菌株	ソース	適用
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	JCM2895	Japan Collection of Microorganisms	Source of pRE2895
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	DSM8424	German Collection of Microorganisms and Cell Cultures	Source of pRE8424
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	JCM2893	Japan Collection of Microorganisms	Source of pRE2893
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	JCM2894	Japan Collection of Microorganisms	Source of pRE2894
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	DSM43200	German Collection of Microorganisms and Cell Cultures	Source of pRE43200
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	JCM3201	Japan Collection of Microorganisms	Host strain to express recombinant proteins
<i>Rhodococcus fascians</i>	JCM10002	Japan Collection of Microorganisms	Host strain to express recombinant proteins
<i>Rhodococcus opacus</i>	DSM44193	German Collection of Microorganisms and Cell Cultures	Host strain to express recombinant proteins
<i>Rhodococcus ruber</i>	JCM3205	Japan Collection of Microorganisms	Host strain to express recombinant proteins
<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	JCM3202	Japan Collection of Microorganisms	Host strain to express recombinant Proteins
<i>Streptomyces coelicolor</i>	JCM4979	Japan Collection of Microorganisms	Source of <i>dnak</i> transcription terminator
<i>Escherichia coli</i>	DH5 $\alpha$		General cloning
<i>Escherichia coli</i>	ER2508	New England Biolabs	Source of <i>Kan<sup>r</sup></i>

表 3

pNit-QC2 と pNit-RC2 の形質転換効率

プラスミド	宿主細胞		
	<i>R. erythropolis</i>	<i>R. fascians</i>	<i>R. opacus</i>
pNit-QC2	$3.8 \times 10^5$	$8.2 \times 10^2$	$1.6 \times 10^4$
pNit-RC2	$2.8 \times 10^5$	$4.0 \times 10^2$	$5.2 \times 10^2$

表 4

R.erythropolis JCM 3201 株におけるプラスミド不和合性

第一の形質転換に用いたプラスミド	第二の形質転換に用いたプラスミド	第二の形質転換の効率	第一の形質転換に用いたプラスミドが残っていたコロニーの率 (%; $n = 20$ )
なし	pNit-QT2	$3.2 \times 10^5$	-
pNit-QC2	pNit-QT2	$2.0 \times 10^3$	50
pNit-RC2	pNit-QT2	$1.3 \times 10^5$	100
なし	pNit-RT2	$4.4 \times 10^4$	-
pNit-QC2	pNit-RT2	$3.3 \times 10^4$	100
pNit-RC2	pNit-RT2	$2.4 \times 10^2$	65

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

産業上の利用の可能性

本発明の新規なローリングサークル型の複製様式で複製し得るベクターであって、*Rhodococcus* 属細菌中で外来遺伝子を 4℃から 35℃の温度条件下で誘導物質により誘導発現しうる発現ベクターおよび外来遺伝子を誘導物質非依存的に構成的に発現し得るベクターを用いることにより、効率的に *Rhodococcus* 属細菌で外来タンパク質を産生させることができ、特に宿主微生物として低温でも増殖し得る微生物を用いることにより、通常の微生物の増殖に適した温度条件、即ち約 15℃を超える中高温で発現させることが困難であるかまたは不可能なタンパク質を発現産生させることが可能である。さらに、互いにプラスミド不和合性を起こさない少なくとも 2 種類の *Rhodococcus* 属細菌由来の発現プラスミドベクターであって、少なくとも 2 種類のプラスミドが、プラスミドの自律複製に必要な DNA 配列として、それぞれローリングサークル型複製様式をもつ DNA 配列と、pRE2895 由来のプラスミドの自律複製に必要な DNA 配列を有するベクターは不和合性の問題を起こすことなく、同一の微生物細胞中で安定に維持され、それぞれのベクターが含む外来遺伝子がコードするタンパク質を同一の微生物細胞中で共発現させることが可能である。

#### 配列表フリーテキスト

配列 1～48：プライマー、リンカー

配列 49～56：ベクター

配列 57～89：プライマー、リンカー

配列 90：内在性プラスミド pRE8424

配列 91～106：ベクター

配列 107：改変 *TipA* 遺伝子プロモーター

## 請求の範囲

1. *TipA* 遺伝子プロモーターの-10 領域配列に変異を導入したプロモーターであって、チオストレプトン非依存的に構成的に下流に存在する遺伝子を発現し得る変異 *TipA* 遺伝子プロモーターの有する塩基配列からなる DNA。
2. -10 領域配列の変異が、CAGCGT 配列の TATAAT 配列への変異である請求項 1 記載の DNA。
3. 配列番号 107 で表される塩基配列を有する、請求項 2 記載の DNA。
4. 外来遺伝子を構成的に発現するためのプロモーター配列が請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の DNA の有する塩基配列であって、その下流にリボソーム結合部位配列、更にその下流に、外来遺伝子を導入可能なマルチクローニング部位配列を含む、*Rhodococcus* 属細菌用構成型発現ベクター。
5. 配列番号 101 に表される塩基配列を有する pNit-RT1、配列番号 102 に表される塩基配列を有する pNit-RT2、配列番号 105 に表される塩基配列を有する pNit-RC1、配列番号 106 に表される塩基配列を有する pNit-RC2、配列番号 99 に表される塩基配列を有する pNit-QT1、配列番号 100 に表される塩基配列を有する pNit-QT2、配列番号 103 に表される塩基配列を有する pNit-QC1、配列番号 104 に表される塩基配列を有する pNit-QC2、からなる群から選択される請求項 4 記載の *Rhodococcus* 属細菌用構成型発現ベクター。
6. *Rhodococcus* 属細菌が *R. erythropolis*、*R. fascians* および *R. opacus* からなる群から選択される、請求項 4 または 5 に記載の発現ベクター。
7. さらに大腸菌用プラスミドの自律複製に必要な DNA 領域を含み、大腸菌中で複製可能な請求項 4 から 6 のいずれか 1 項に記載の発現ベクター。
8. 請求項 4 から 7 のいずれか 1 項に記載の発現ベクターを含む形質転換体。
9. 請求項 4 から 7 のいずれか 1 項に記載の発現ベクターを用いて 4℃ から 35℃ の温度で組換えタンパク質を生産する方法。

図 1

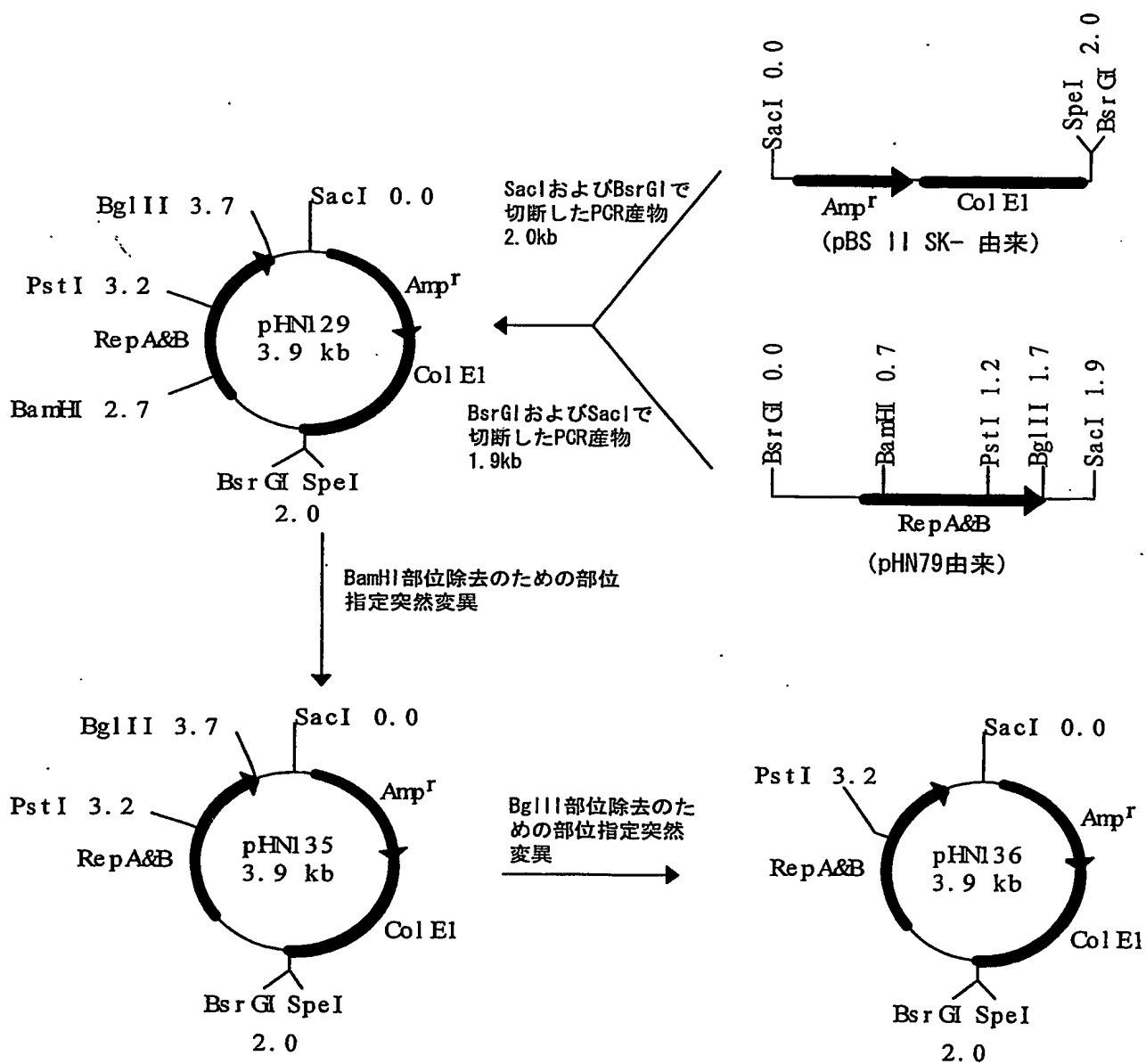


図 2

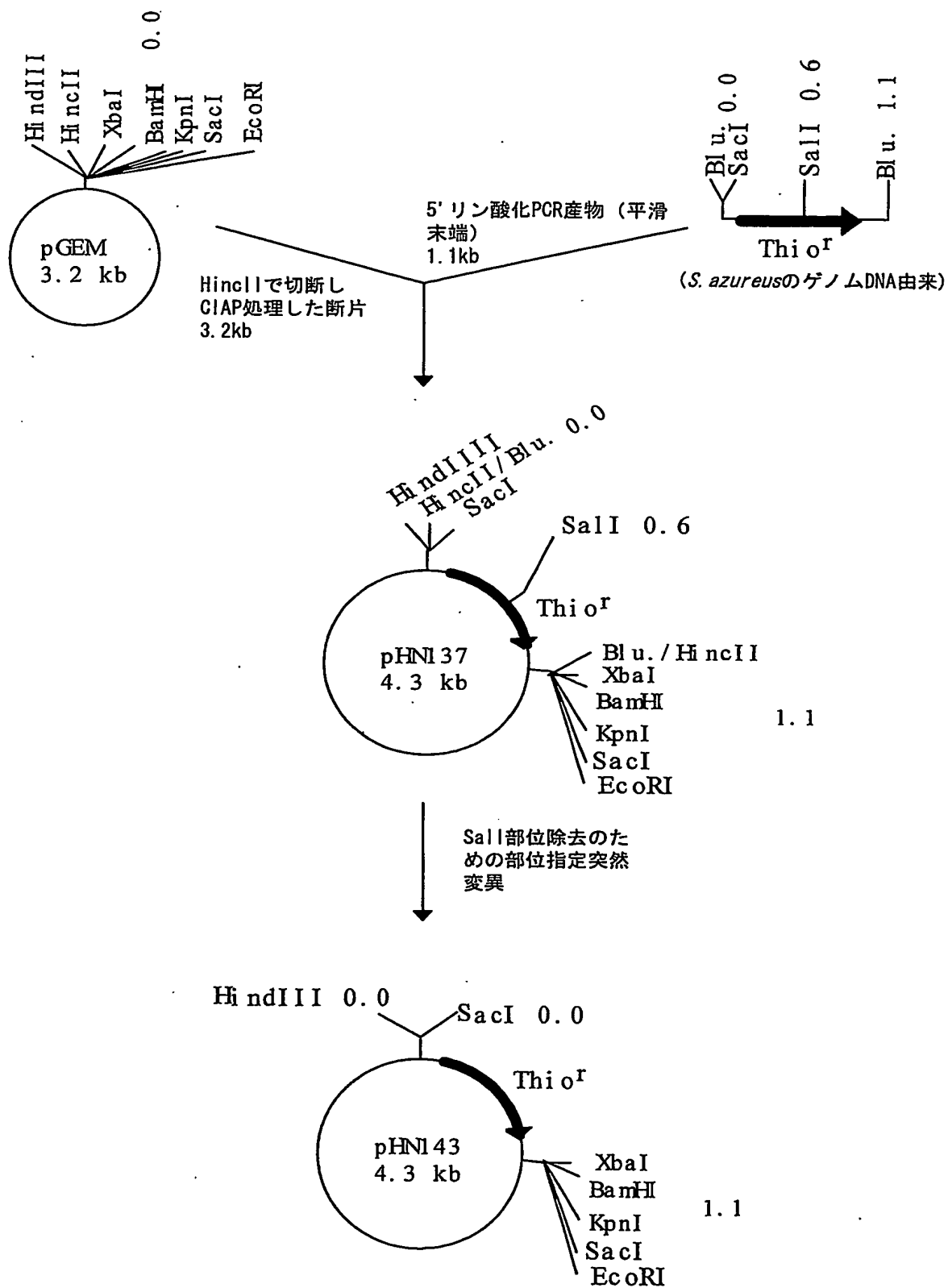




图 3

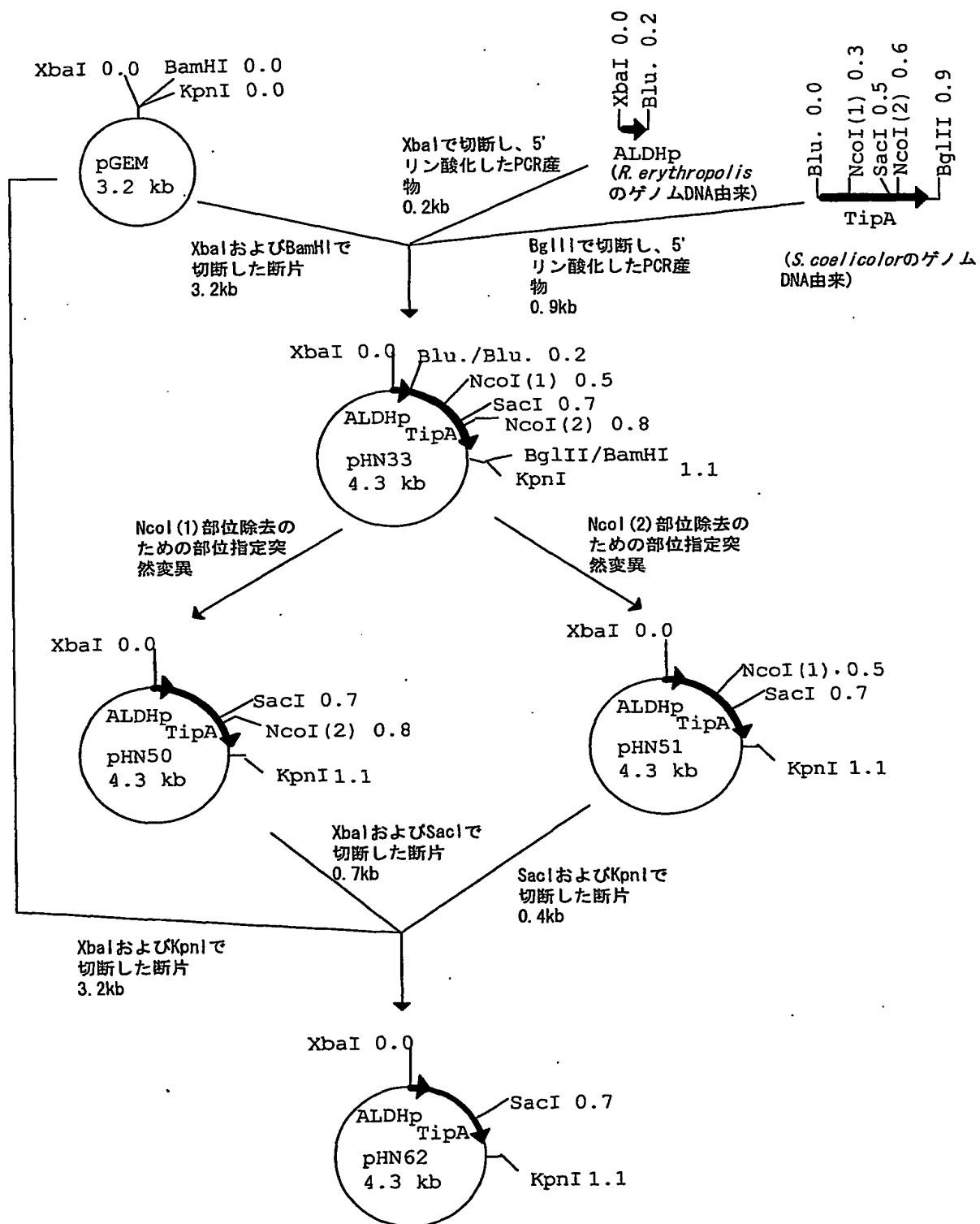


図 4

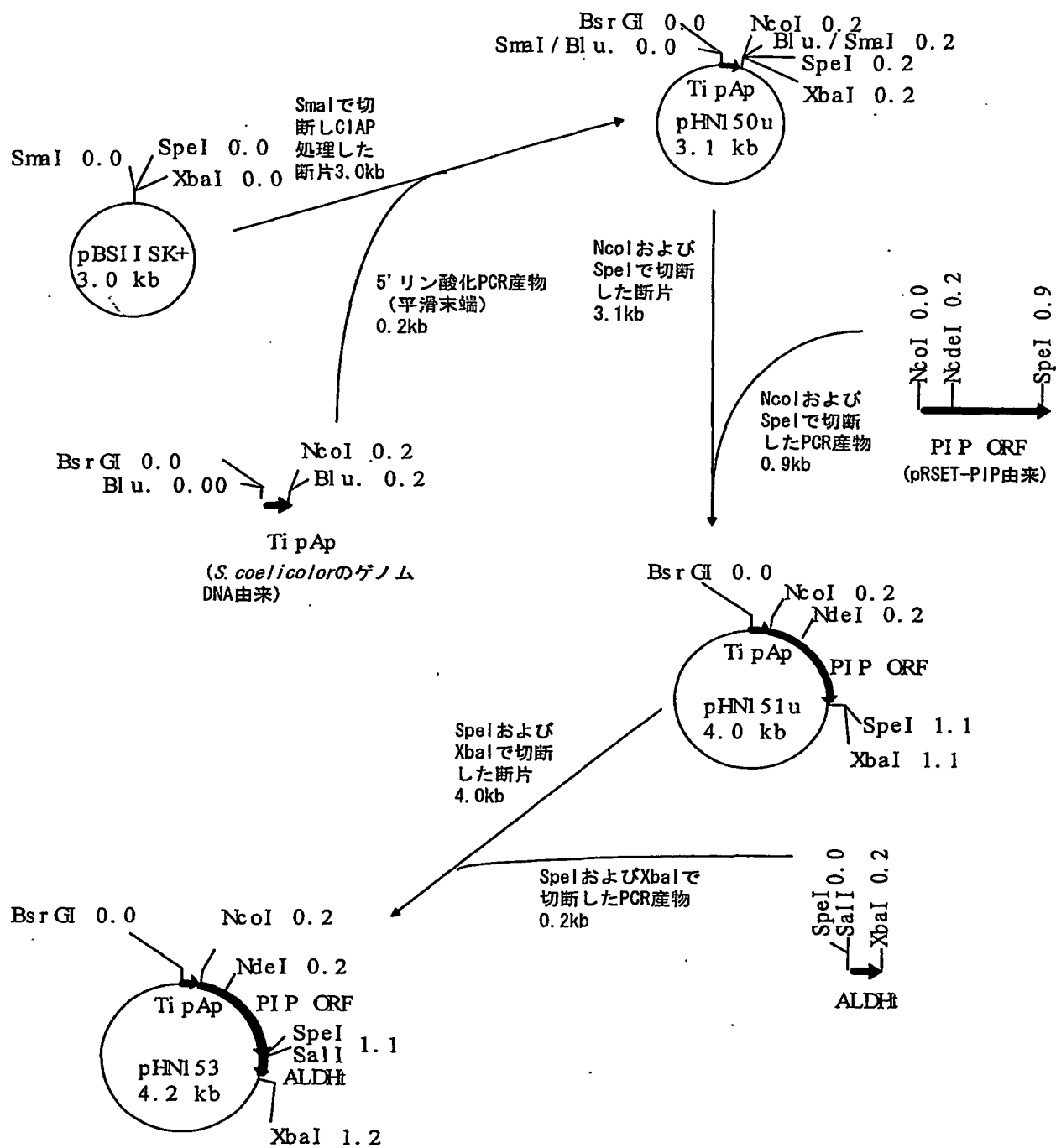


図 5

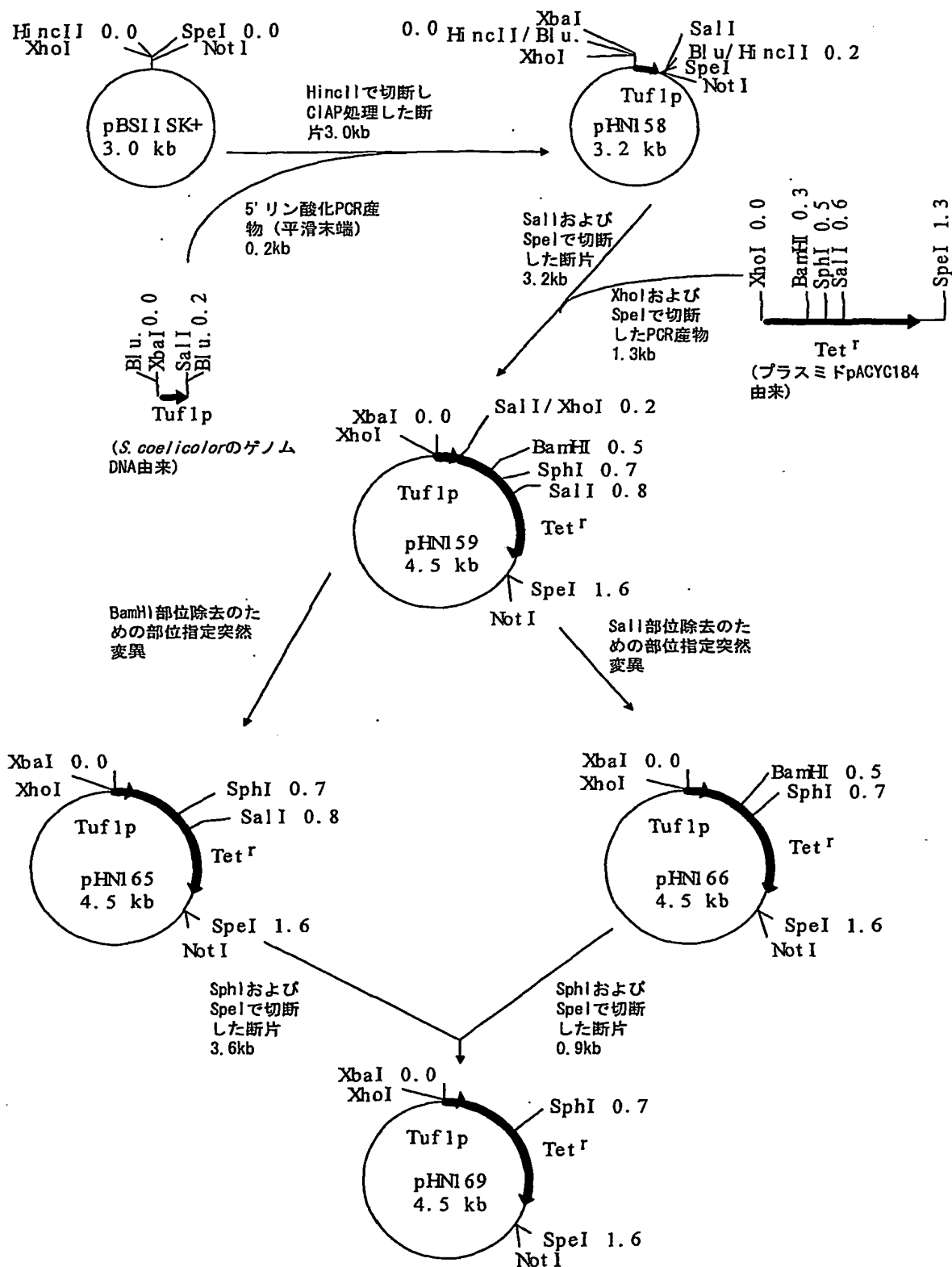


図 6

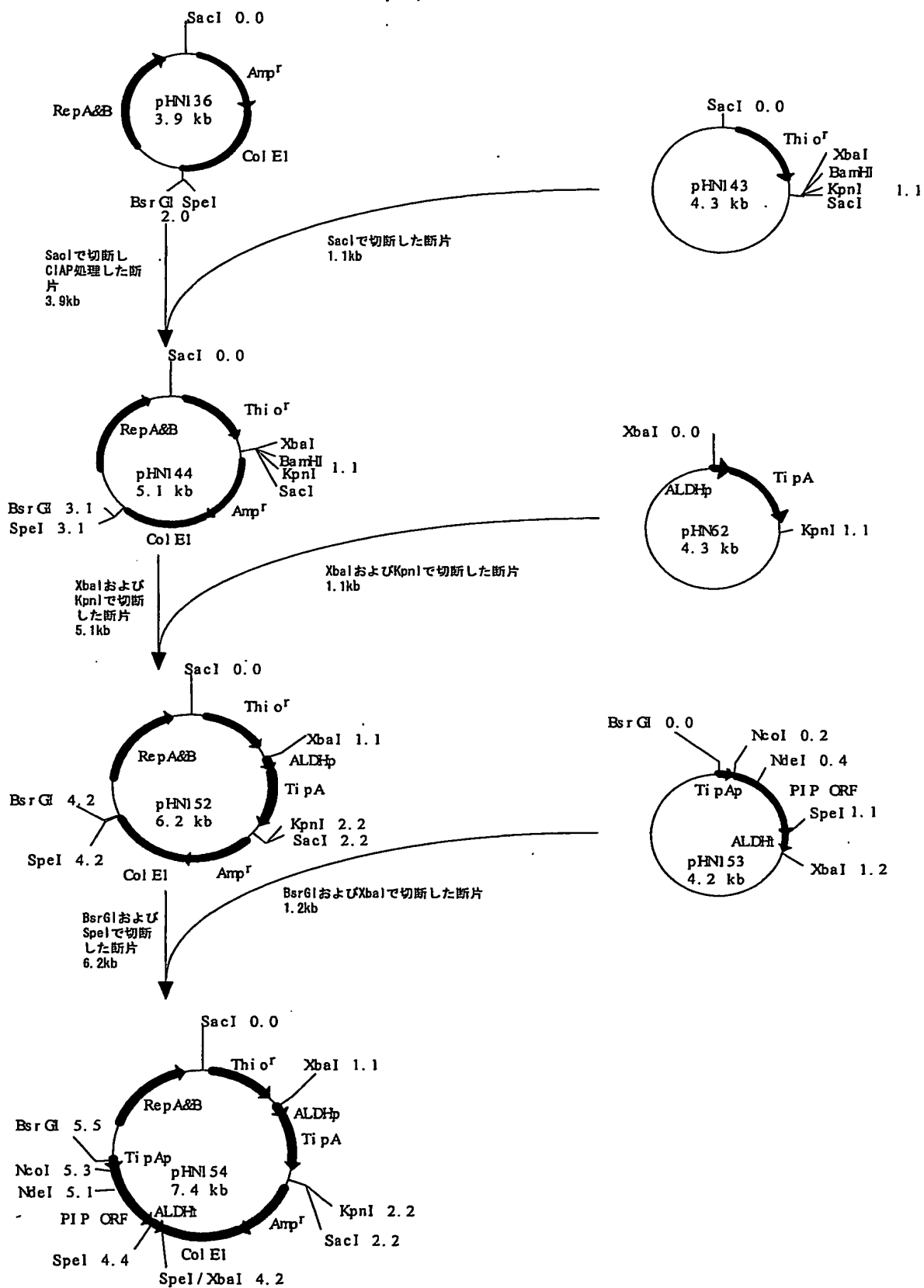


図6 (つぎ)

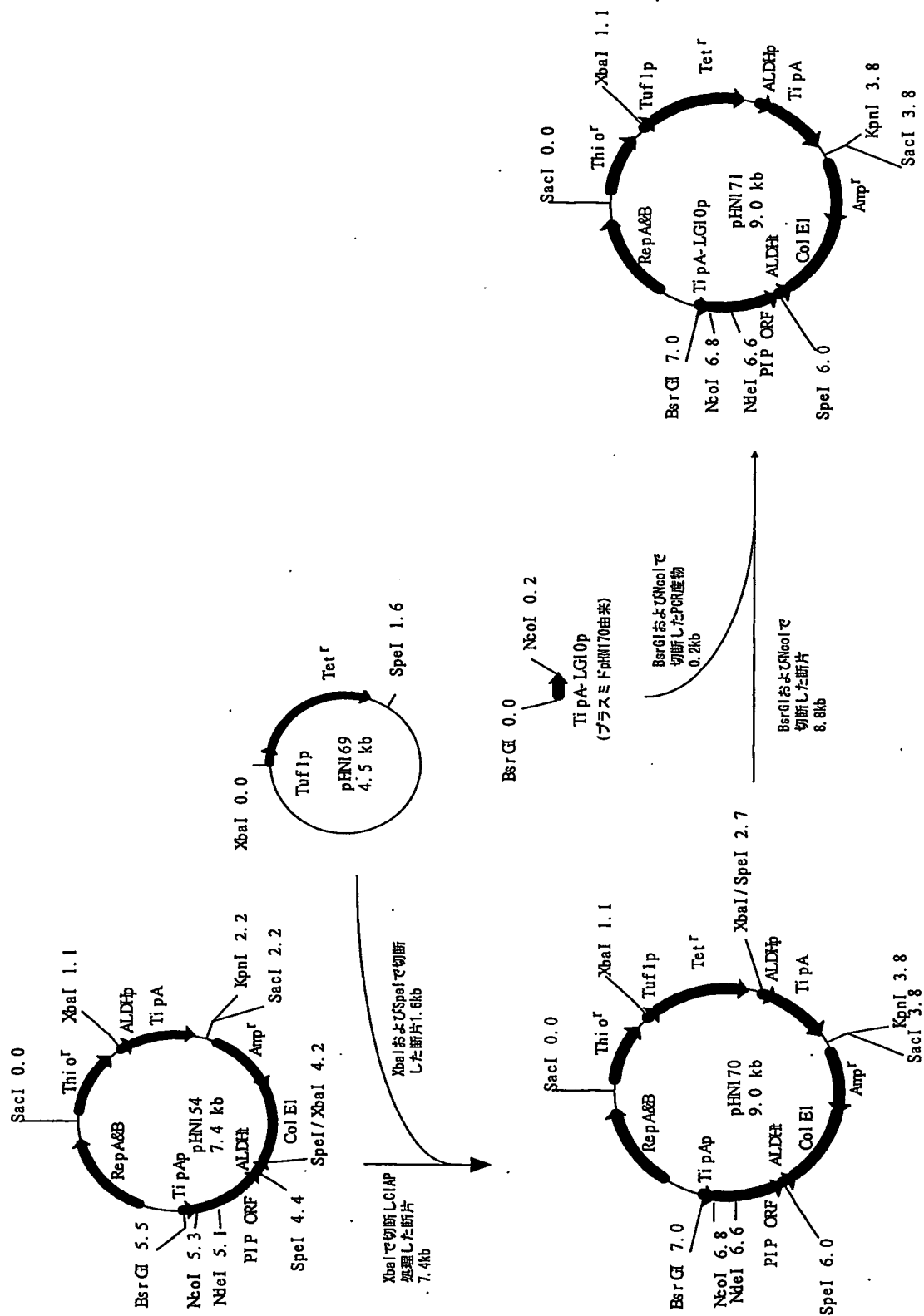


図 7

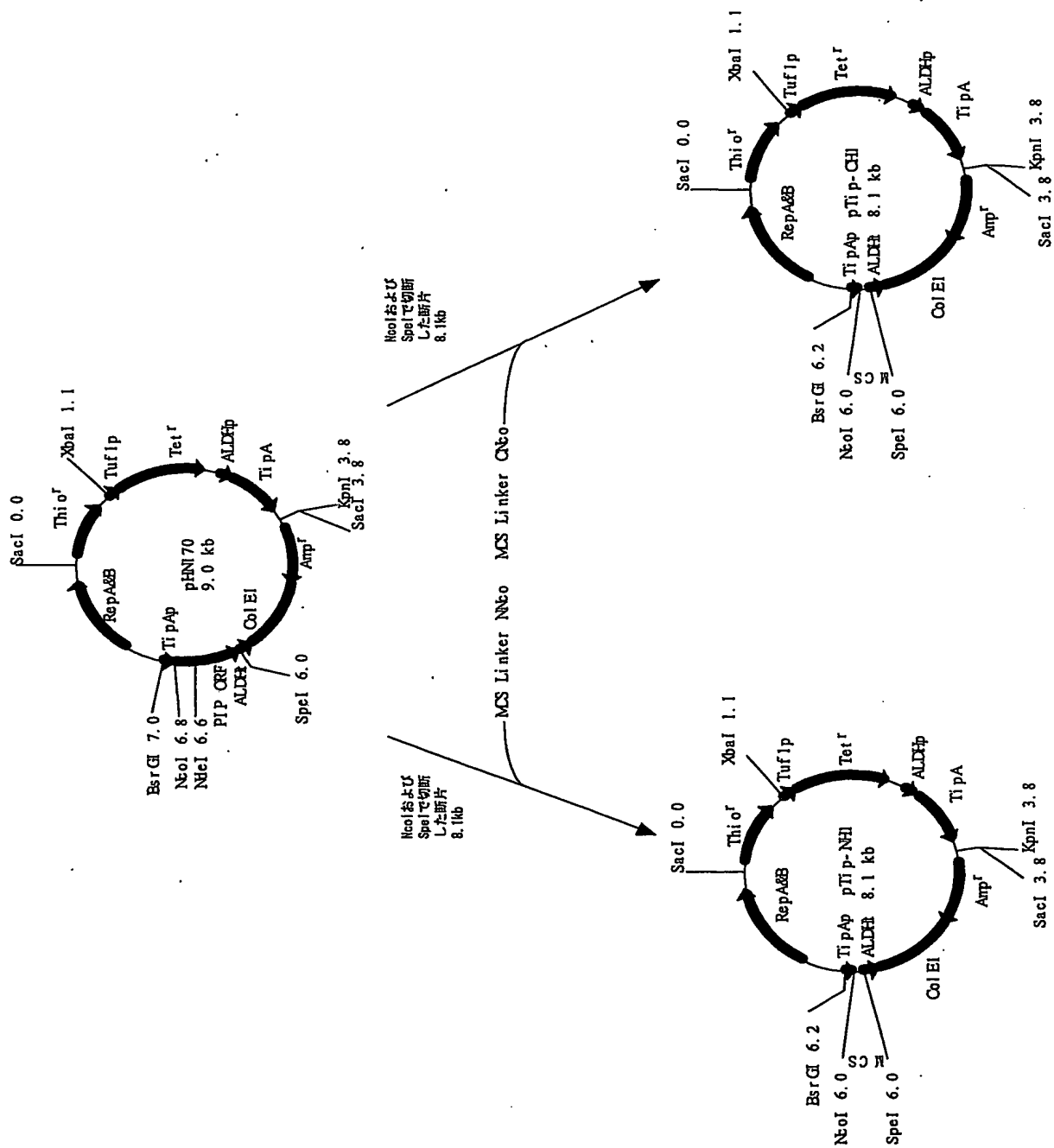


図7 (77頁)

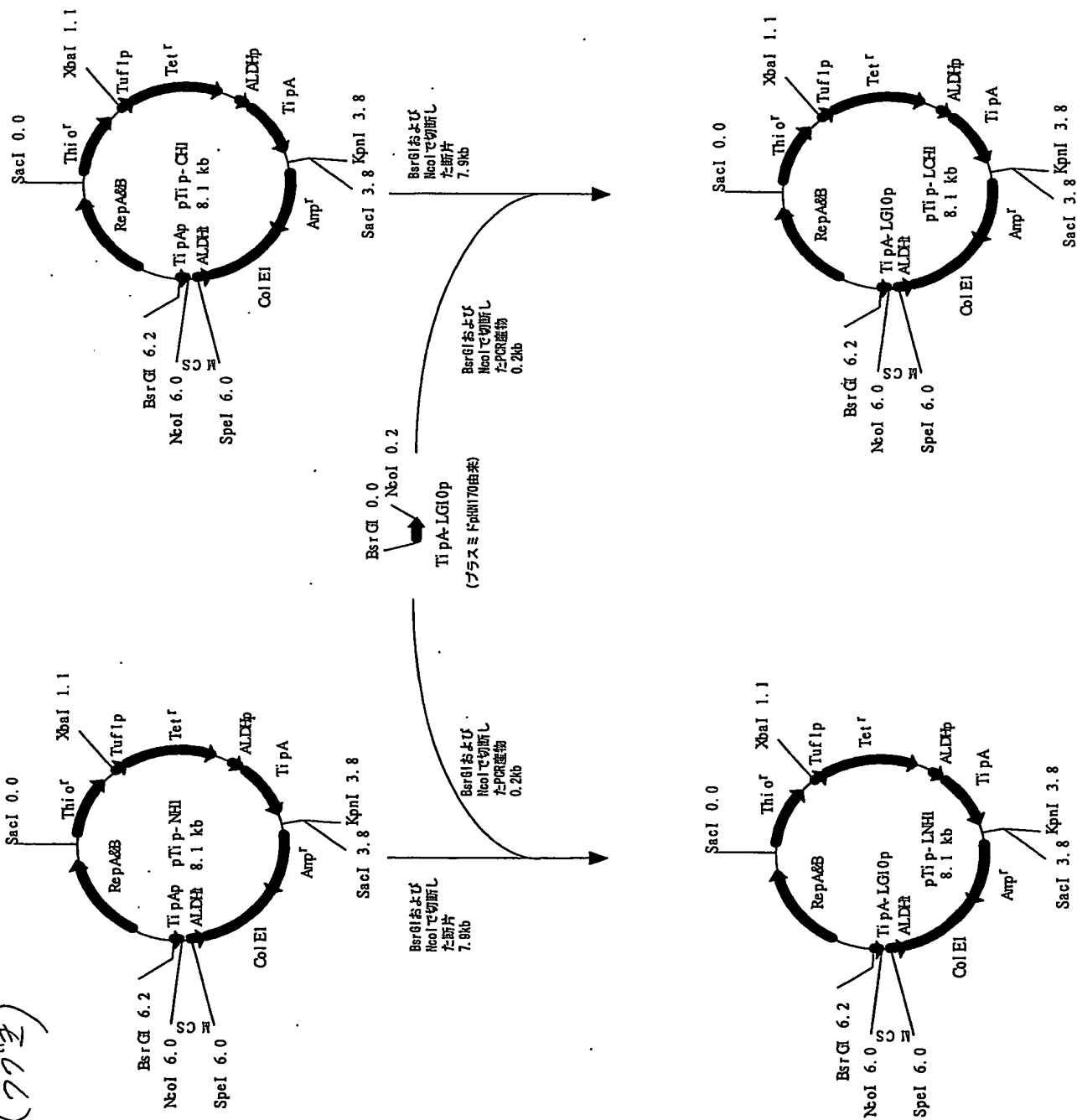


図 8

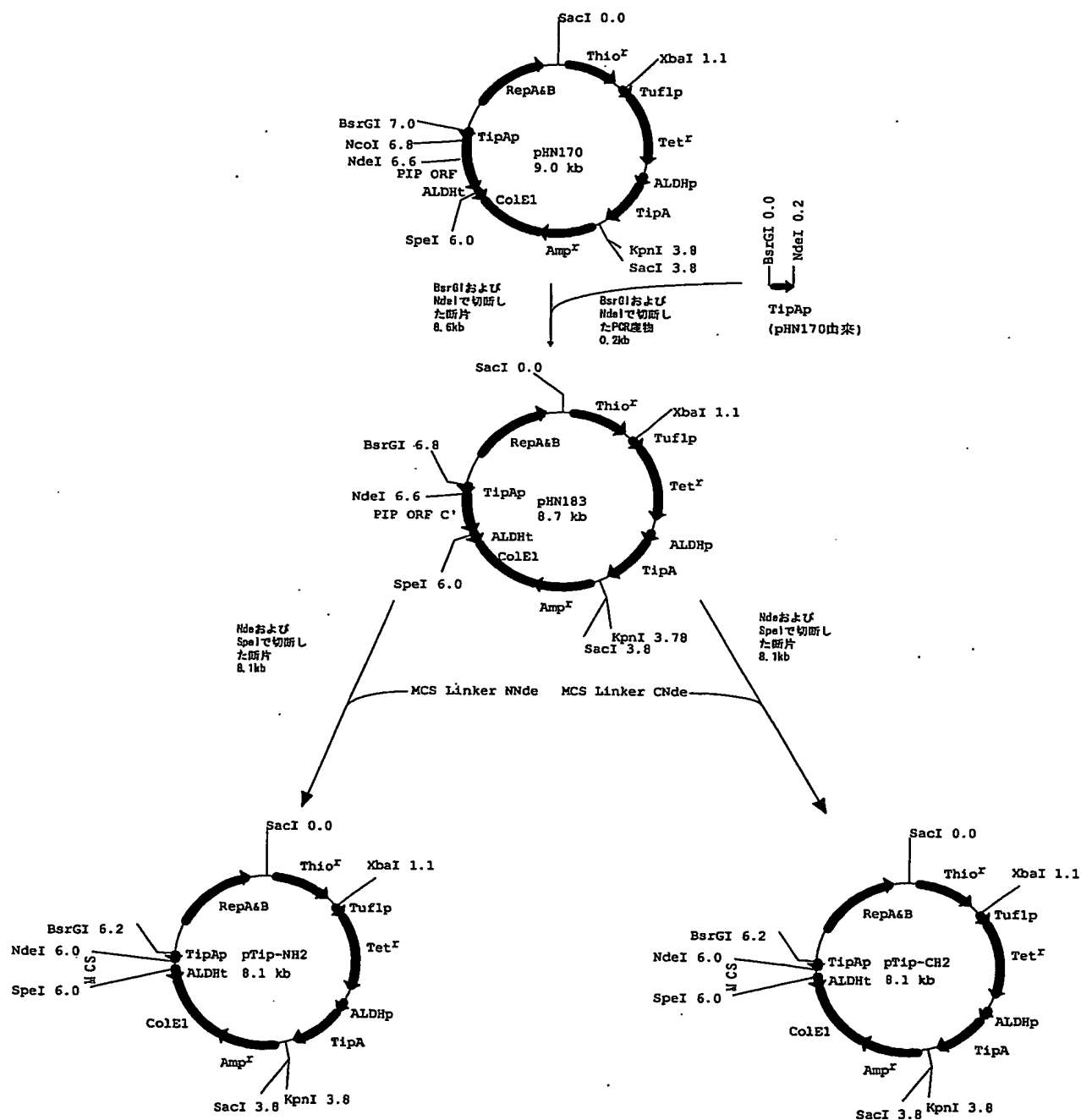
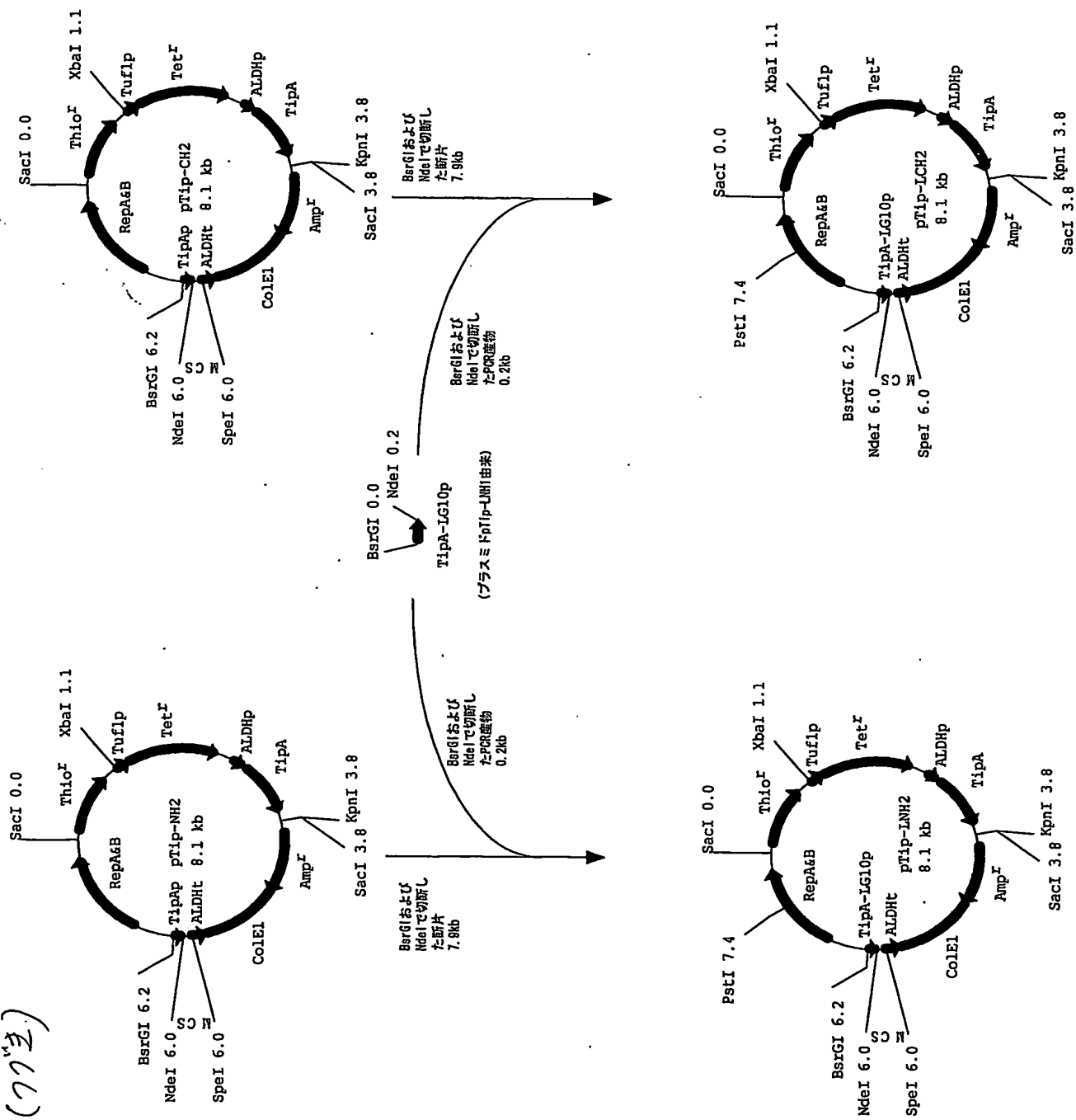


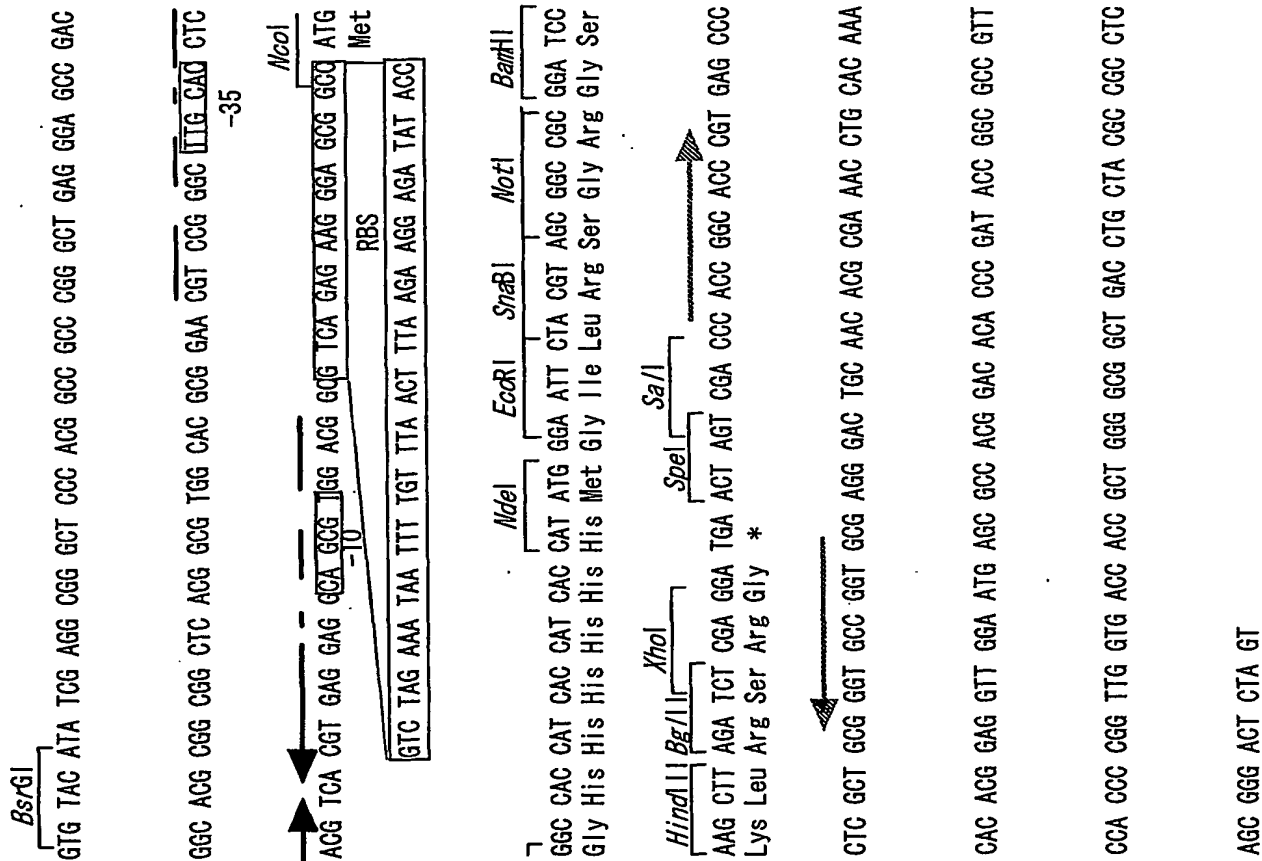


図8 (77頁)





9b



9c

BsrGI  
GTG TAC ATA TCG AGG CGG GCT CCC ACG GCC CGG GCT GAG GGA GCC GAC

GGC ACG CGG CGG CTC ACG GCG TGG CAC GCG GAA CGT CCG GGC TTG CAG CTC  
-35

ACG TCA CGT GAG GAG GCA GCG TGG ACG GCG TCA GAG AAG GGA GCG GCG ATG  
-10 RBS Met  
GTC TAG AAA TAA TTT TGT TTA ACT TTA AGA AGG AGA TAT ACC

EcoRI SnaBI NotI BamHI HindIII BglII XhoI  
GGA ATT CTA CGT AGC GGC CGC GGA TCC AAG CTT AGA TCT CGA GGA CAT CAC  
Gly Ile Leu Arg Ser Gly Arg Gly Ser Lys Leu Arg Ser Arg Gly His His

SpeI SaI  
CAT CAC CAT CAC TGA ACT AGT CGA CCC ACC GGC ACC CGT GAG CCC CTC GCT  
His His His His \*

CGG GGT GCC GGT GCG AGG GAC TGC AAC ACG CGA AAC CTG CAC AAA CAC ACG

GAG GTT GGA ATG AGC GCC ACG GAC ACA CCC GAT ACC GGC GCC GTT CCA CCC

CGG TTG GTG ACC ACC GCT GGG GCG GCT GAC CTG CTA CCG CCG CTC AGC GGG

ACT CTA GT

9 d

*Bsr*GI  
GTG TAC ATA TCG AGG CGG GCT CCC ACG GCC CGG GCT GAG GGA GCC GAC

GGC ACG CGG CGG CTC ACG GCG TGG CAC GCG GAA CGT CCG GGC TTG CAG CTC  
-35

ACG TCA CGT GAG GAG GCA GCG TGG ACG GCG TCA GAG AAG GGA GCG CAT ATG  
-10  
Met  
RBS  
G TCT AGA AAT AAT TTT GTT TAA CTT TAA GAA GGA GAT ATA CAT  
*Nde*I

*Nco*I *Eco*RI *Sna*BI *Not*I  
GGC CAT CAC CAT CAC CAT CAC GCC ATG GGA ATT CTA CGT AGC GGC CGC GGA  
Gly His His His His His Ala Met Gly Ile Leu Arg Ser Gly Arg Gly

*Bam*HI *Hind*III *Bgl*II *Xho*I *Spe*I *Sa*I  
TCC AAG CTT AGA TCT CGA GGA TGA ACT AGT CGA CCC ACC GGC ACC CGT GAG  
Ser Lys Leu Arg Ser Arg Gly \*

CCC CTC GCT GCG GGT GCC GGT GCG AGG GAC TGC AAC ACG CGA AAC CTG CAC

AAA CAC ACG GAG GTT GGA ATG AGC GCG ACG GAC ACA CCC GAT ACC GGC GCC

GTT CCA CCC CGG TTG GTG ACC ACC GGT GGG GCG GCT GAC CTG CTA CGC CGC

CTC AGC GGG ACT CTA GT

9 e

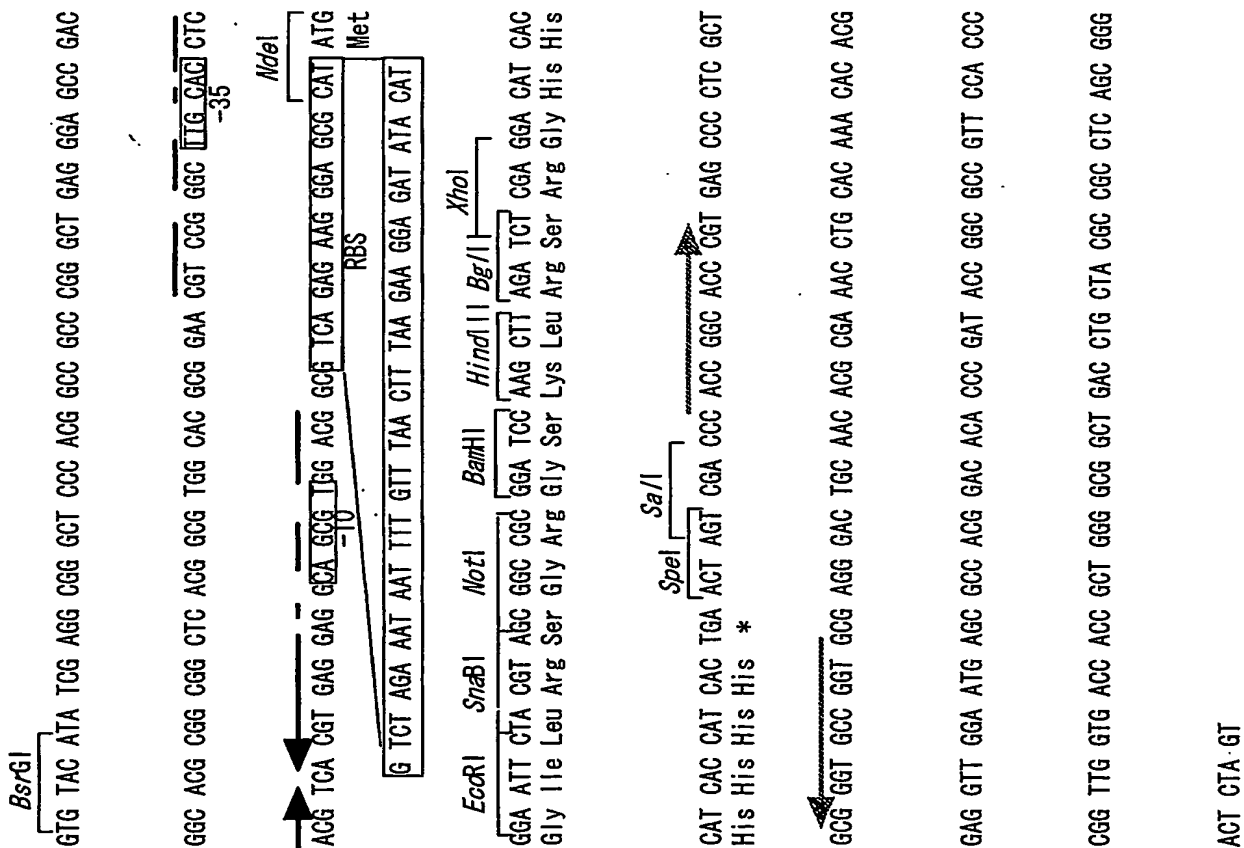


図 10

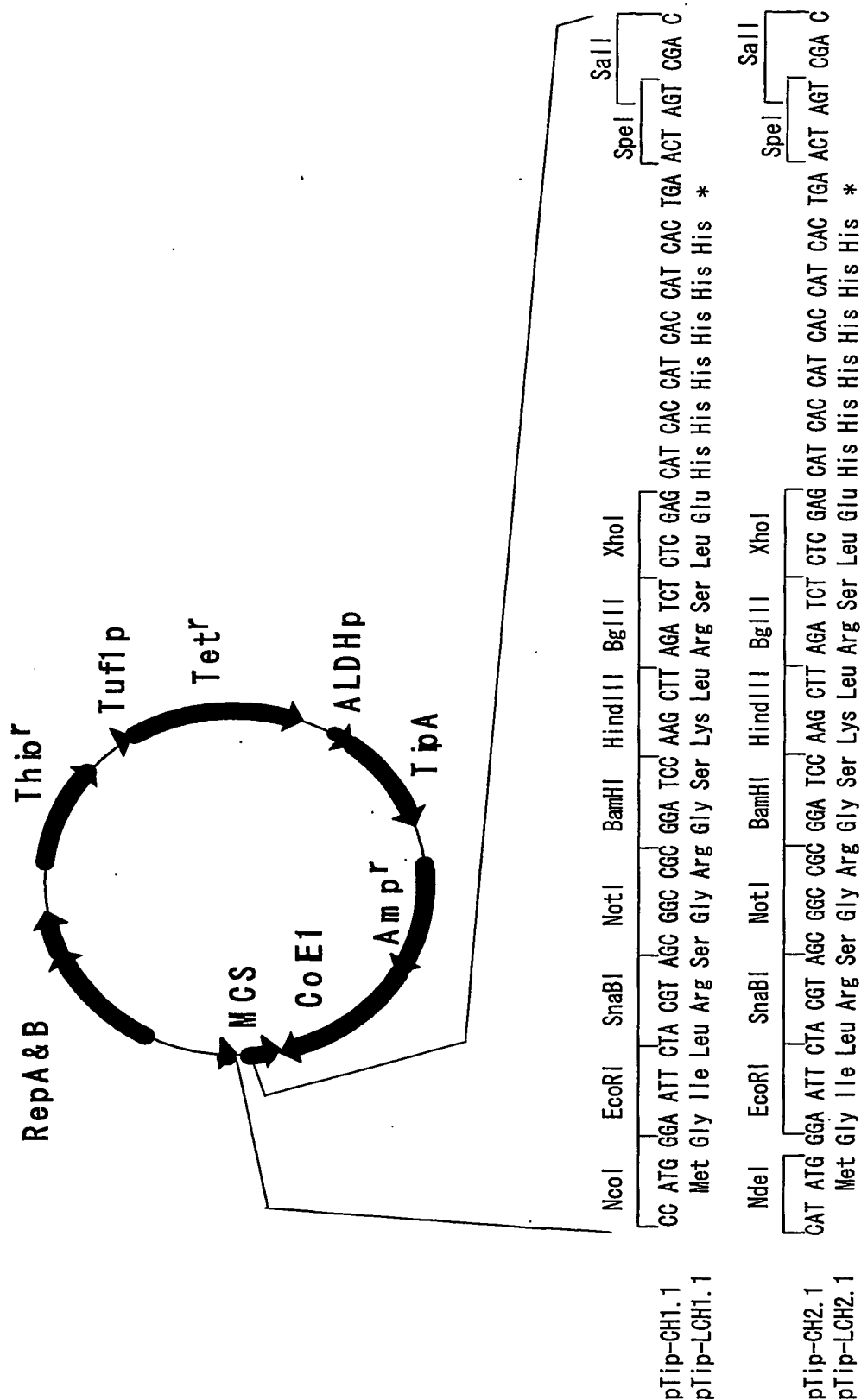


図 11

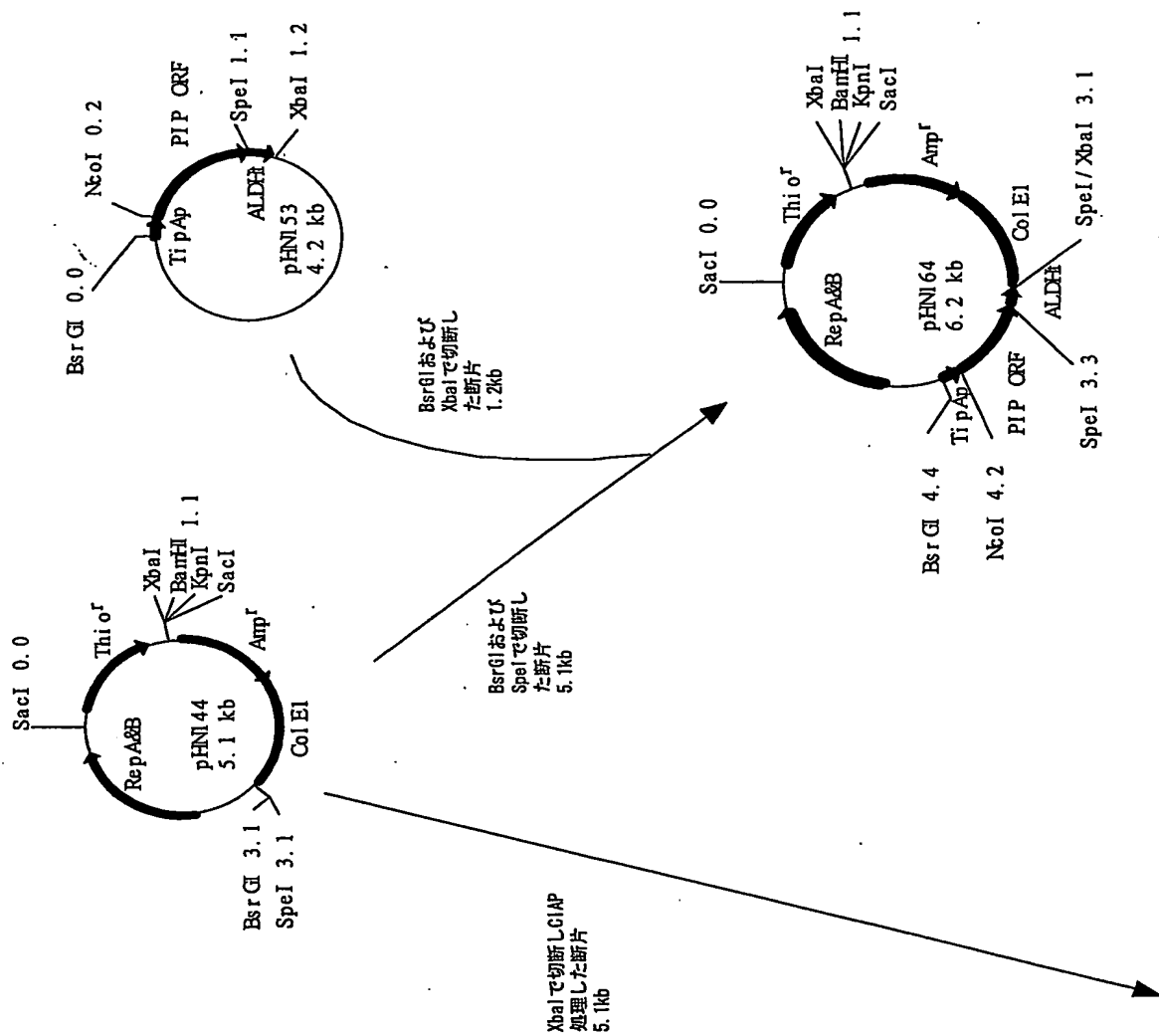




図 1 1 (つづき)

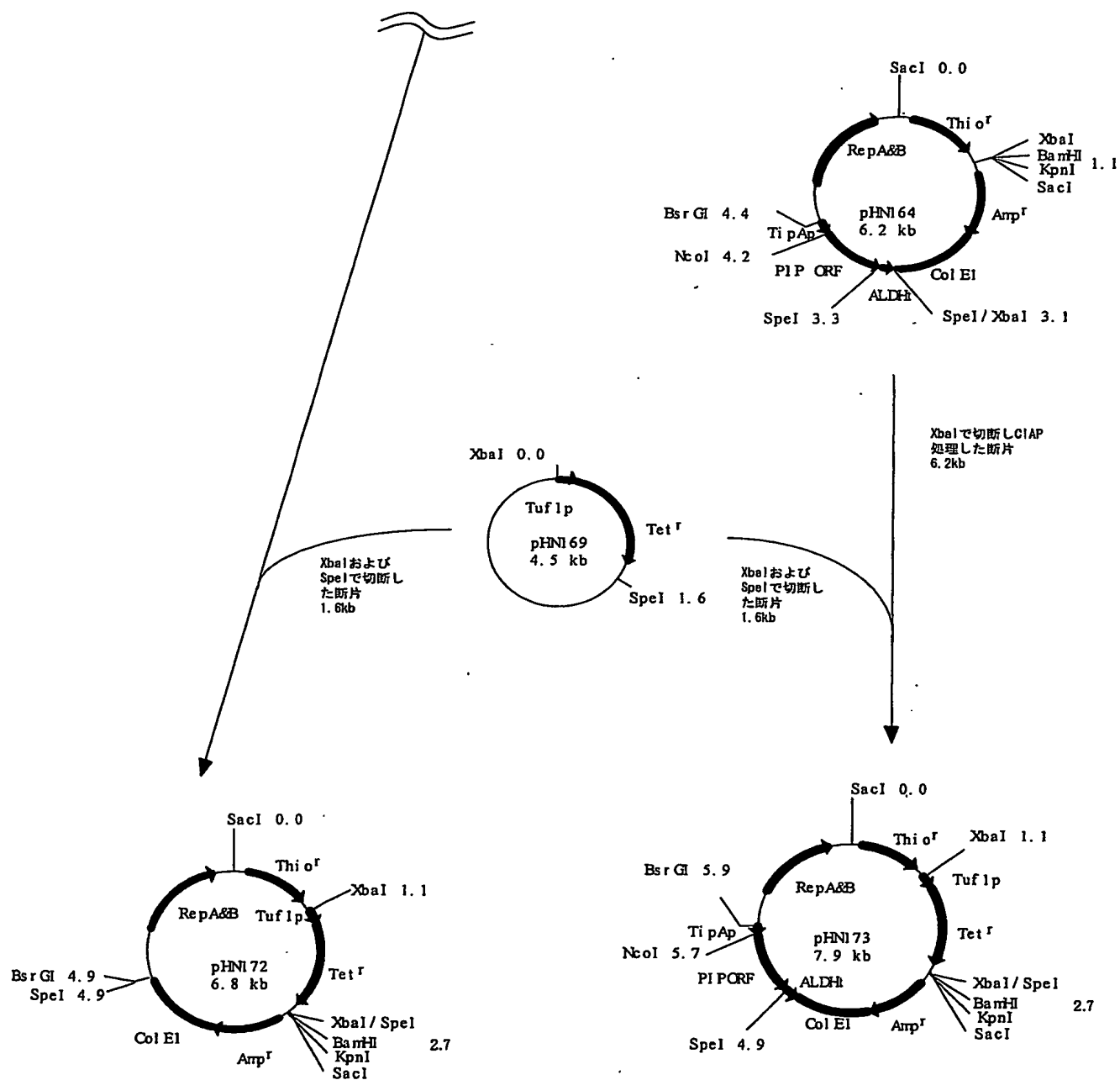


図12

cgccgggctgaggagccgacggcacgcggtcac

ggcgtggcacgcggaacgtccgggctgcacctcacgtc  
-35

acgtgaggaggcagcgtggacggcgtcagagaaggagc  
-10 +1 SD

RBS

ggccatg

図 13

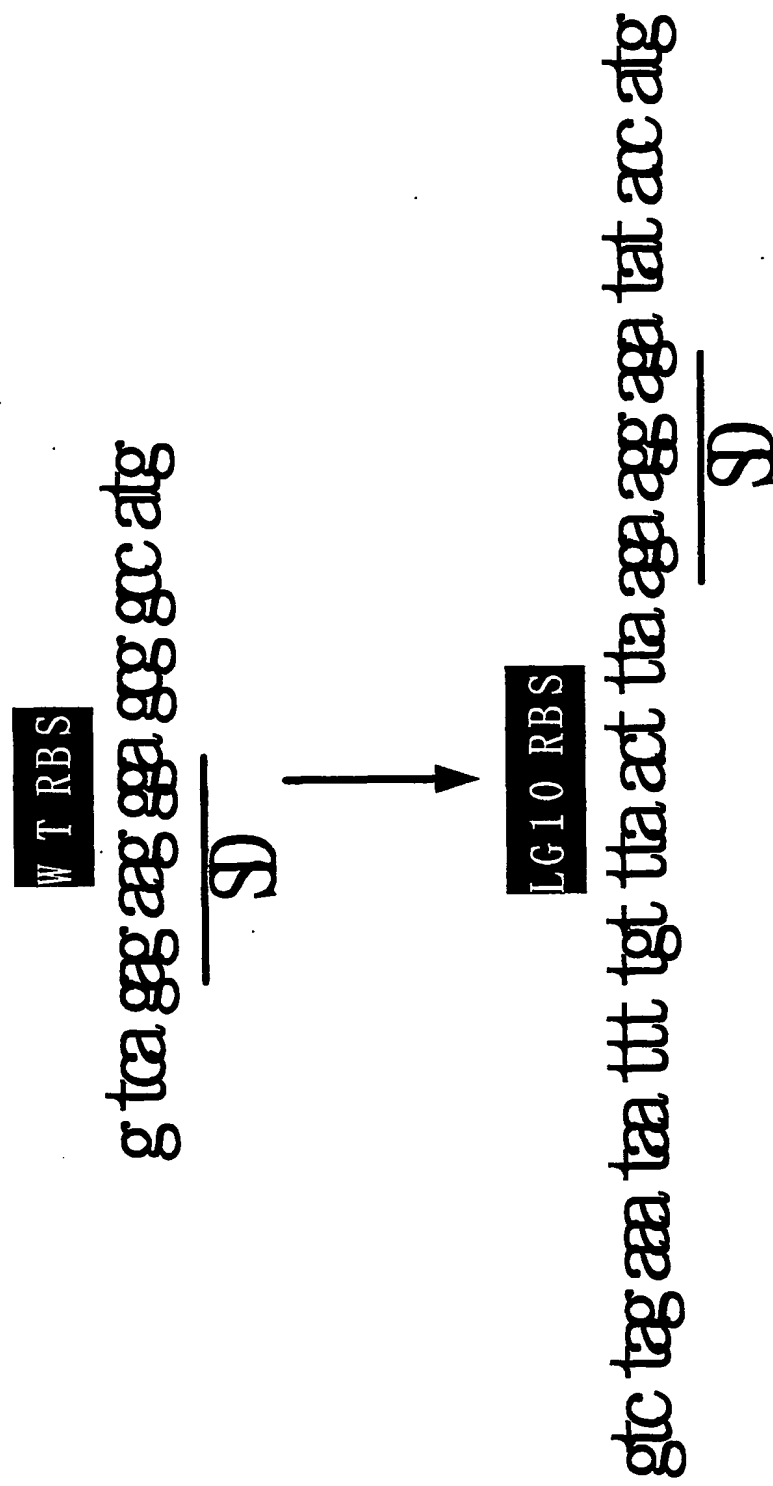
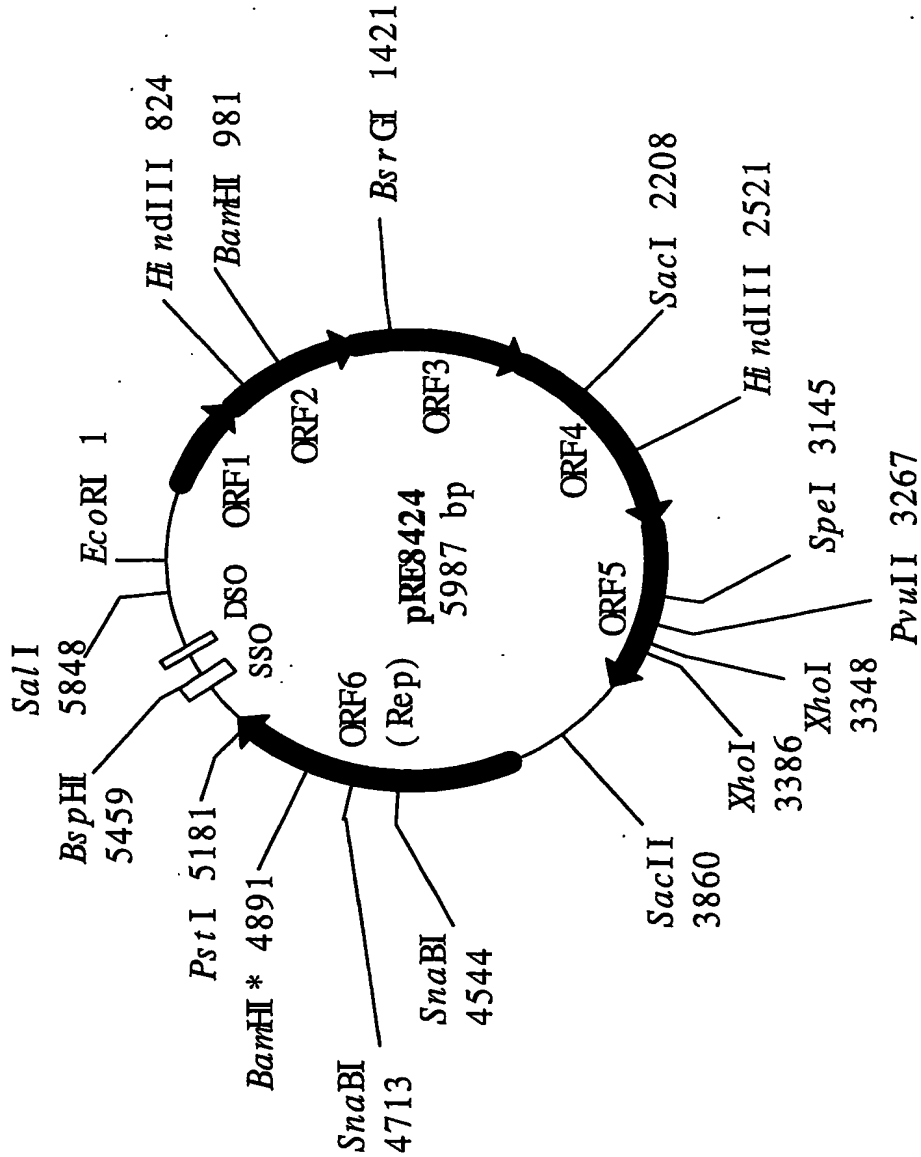


図 14



15

	Motif IV	Motif I	Motif II	Motif III
Consensus	GLXXCGXXWCPXC	Xvt XTXRH	gXXgXXr a Xe Xi Xg XXn GwHXHXh Xi X	l a XXXXXQqX
pRE8424	68 GLRSCGKGW CPCC	26 MVTMTMRH	33 GCDGYVRAVEI THGK-NGWHVHVHALL	53 LAAYLTKI AS
pAP1	138 GLHTCGSVWACPVC	27 M.LTLTQRH	33 GLVGYVRANEI THGK-HGWHVHSHVLI	67 I GNVVSKMQT
pBL1		76 MFVGTVRH	34 VEHTYSDYEVTD S WA-NGWHLHRNMLL	54 MAJYLAAGMS
pJV1	38 GLVRCGRI WFCPEC	27 LVFTTARH	77 GYI GMRRAAEVTRSKKNGYHPHLNLLV	80 LIHMLTKNQD
pIJ101	20 GLMRCGRI WLC PVC	27 LVFTTARH	59 GYVGM RATEVTVCQI NGWPHI HAI V	69 LAHYI AKTQD
pSN22	20 GLMRCGRI WLC PVC	27 LVFTTARH	59 GYVGM RATEVTVCQI NGWPHI HAI V	69 LAHYI AKTQD
	** ** . ** ** *	:.: * **	: . . . . . : * : * * : . . . . .	: . . . . . : * : * * : . . . . .

C-terminal motif

Consensus	WKeyEXa XXgr Rai XWxr gl r
pRE8424	276 WREFEFGSMGRRAI AWSRGLR
pAP1	365 WKEYEKASFGRRALTWSKGLR
pBL1	250 WREYEVGSKNLR S-SWSRGAK
pJV1	352 WAQYEEALAGRRAI EWRGLR
pIJ101	288 WHEYERATRGRRAI EWTRYLR
pSN22	288 WHEYERATKGRRAI EWTRYLR
	* : : * . * * : * : : :

pRE8424 5705 CGATCGAGCCGA-CCGCT--AGCTGGGGGAG-  
 pAP1 2378 CAGCTATGC-GGA-AAAGTTT--AGCACAA----  
 pBL1 1314 GAAATACAA-CTGA-ACAGCTCTAAGGACCGCA--  
 pJV1 3375 CTCGCAAAACCGA-CCGCT---AGCTAAAGGGTT  
 pIJ101 1346 GACCGAATA-CCGA-ACAGCTT--CCGAAGAAA--  
 pSN22 7805 GACCGAATACCGCTCTCCGCGCTT--CCGAAGAAA--  
 Nicking site

DSO



図 18-1

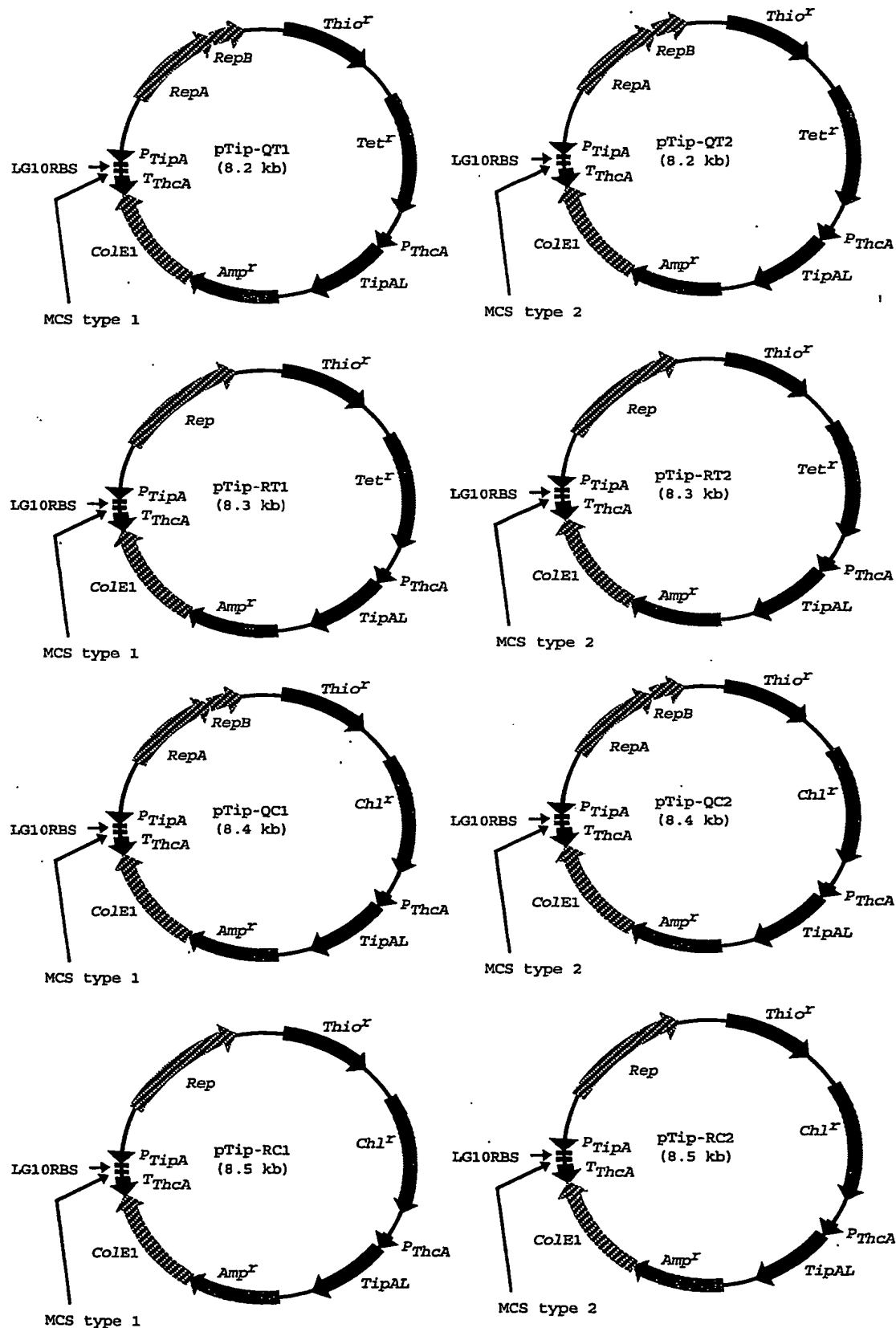
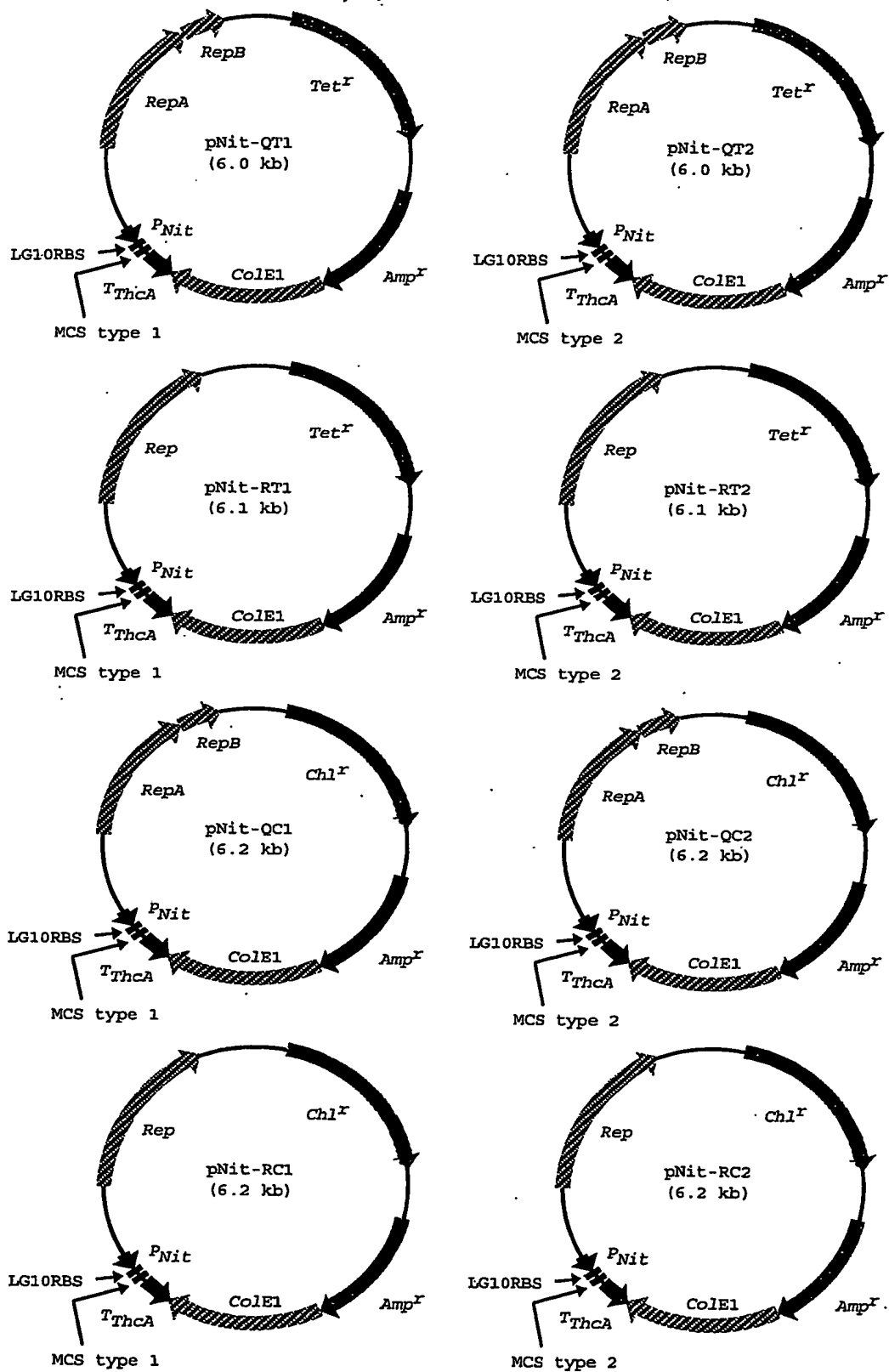




図 18-2





20

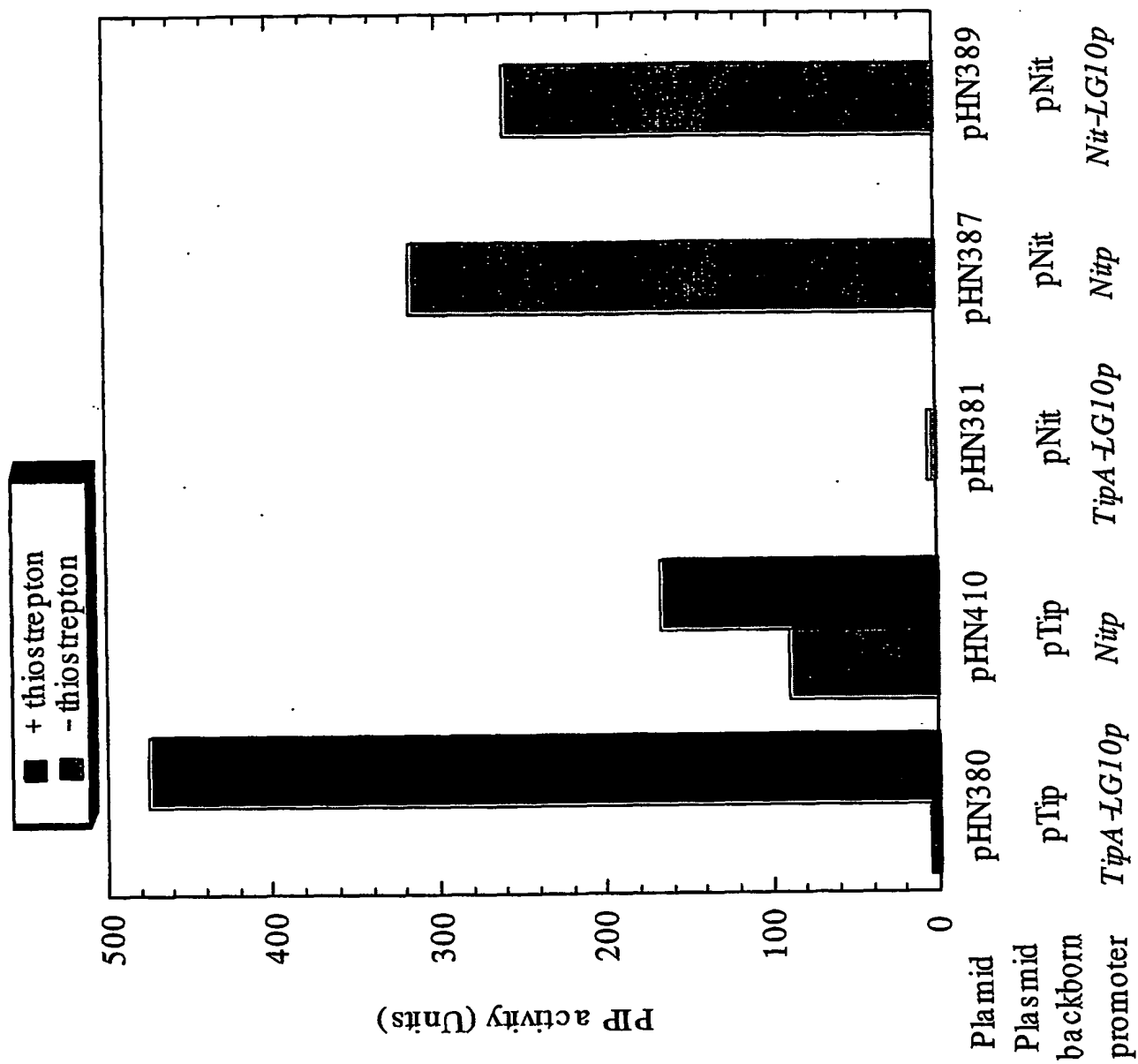
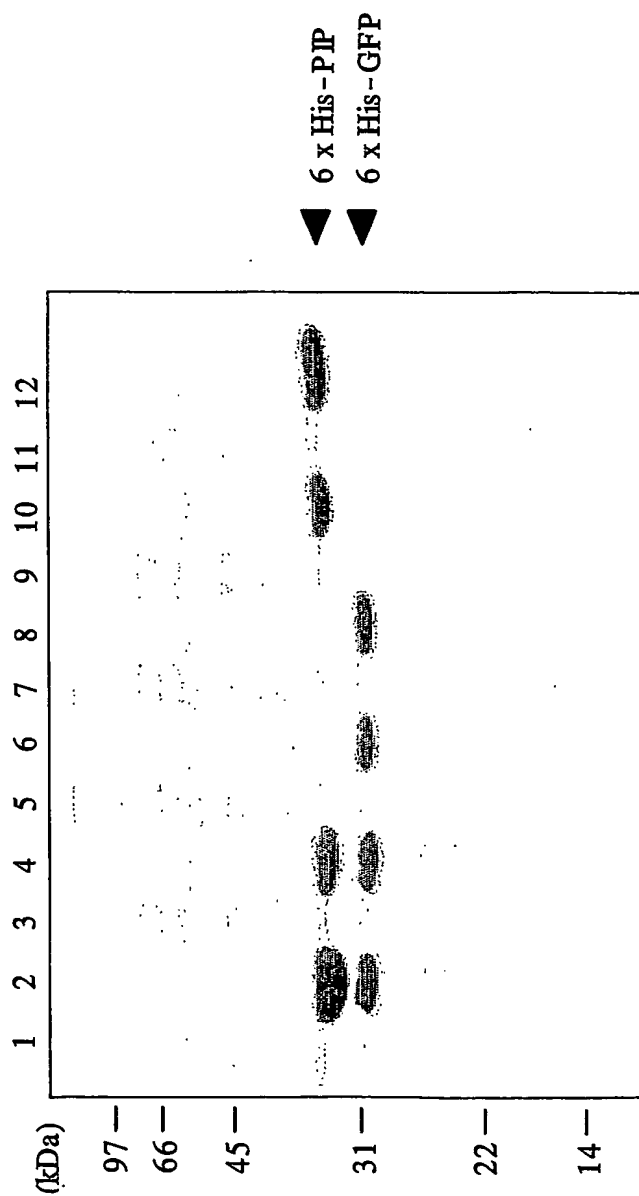


図 21



## SEQUENCE LISTING

<110> National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

<120> A method for producing a recombinant protein by using a single or plural vectors in a bacterium belonging to genus Rhodococcus

<130> PH-2110-PCT

<140>

<141>

<150> JP 2003/116280

<151> 2003-04-21

<160> 107

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN1

<400> 1

cagagctcgt caggtggcac ttttc

25

<210> 2

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN2

<400> 2

gttgtacaac tagtcgtgcc agctgcatta

30

<210> 3

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN120

<400> 3

gctgtacacc cgagaagctc ccagcg

26

<210> 4

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN121

<400> 4

cggagctctt gaacgagagt tggccgttg

29

<210> 5

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN122

<400> 5

tcagatctat cgtcacgac tgcgatcacg ttgacgccg

39

<210> 6

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN123

<400> 6

acggatcctc cgctgaaatc tcgccgtgcc t

31

<210> 7

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN130

<400> 7

cttcatatgc ggagctcgac cgcgcggg

28

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN131

<400> 8

atcgagtcgt tcaagggcgt cggc

24

<210> 9

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer NEB1233

<400> 9

agcggataac aatttcacac agg

23

<210> 10

<211> 19

<212> DNA



<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN10

<400> 10

caccaggatg atccccgac

19

<210> 11

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN11

<400> 11

gacagtgaca tcaccagc

18

<210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer NEB1224

<400> 12

cgccagggtt ttcccagtcg cgac

24

<210> 13

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN40

<400> 13

atgagctact ccgtgggaca ggtg

24

<210> 14

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN41

<400> 14

tgcagatctt ccgttttcgac gtgacggag

29

<210> 15

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN42

<400> 15

cagtctagaa ttgatctcct cgaccg

26

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN43

<400> 16

tgcaagctcc tatgtaaacg

20

<210> 17

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN55

<400> 17

cgccctgctcc acggccgcc

19

<210> 18

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN56

<400> 18

atggaggcac gcagcatg

18

<210> 19

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN57

<400> 19

cgccccctcg gagtcggcg

19

<210> 20

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN58

<400> 20

atggacgccg ccgaggac

18

<210> 21

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN147

<400> 21

cgtgtacata tcgaggcggg ctccca

26

<210> 22

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN39

<400> 22

atccatggcc gctcccttct ctgacgccgt c

31

<210> 23

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN36

<400> 23

accatggatc aggaatgcat ag

22

<210> 24

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN37

<400> 24

ttactagttt attaatgatg atgatgatga tgcaggtggt tcaggatgaa atccgaaag 59

<210> 25

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN6

<400> 25

cgtctagagt cccgctgagg cggcgtagc

29

<210> 26

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN9

<400> 26

ctactagtcg acccaccggc acccgtgag

29

<210> 27

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN141

<400> 27

aatctagagt aacgggctac tccgtttaac

30

<210> 28

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN142

<400> 28

gggtcgacgg tcctcctgtg gagtggttct

30

<210> 29

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN145

<400> 29

gcactcgaga tgaaatctaa caatgcgctc atc

33

<210> 30

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN152

<400> 30

agactagtcc tcaacgacag gagcacgac

30

<210> 31

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer T7

<400> 31

gtaatacgac tcactatagg gc

22

<210> 32

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence



<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN153

<400> 32

aatccacagg acgggtgtgg

20

<210> 33

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN154

<400> 33

ctctacgccg gacgcatcg

19

<210> 34

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer T3

<400> 34

gcaattaacc ctactaaag gg

22

<210> 35

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN155

<400> 35

acgacgctct cccttatgcg

20

<210> 36

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN156

<400> 36

ccgatgccct tgagagcct

19

<210> 37

<211> 67

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN110

<400> 37

aaccatggta tatctccttc tttaaagttaa acaaaattat ttctagacgc cgtccacgct  
gcctcct

60  
67

<210> 38

<211> 77

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer NNco1

<400> 38

catgggccac catcaccatc accatatggg aattctacgt agcggccgcg gatccaagct 60  
tagatctcga ggatgaa 77

<210> 39

<211> 77

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer NNco2

<400> 39

ctagttcatc ctcgagatct aagcttggat ccgcgccgcg tacgtagaat tcccatatgg 60  
tgatggtgat ggtggcc 77

<210> 40

<211> 71

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer CNco1

<400> 40

catgggaatt ctacgtagcg gccgcggatc caagcttaga tctcgaggac atcaccatca 60  
ccatcactga a 71

<210> 41

<211> 71

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer CNco2

<400> 41

ctagttcagt gatggtgatg gtgatgtcct cgagatctaa gcttggatcc gcggccgcta 60  
cgtagaatc c 71

<210> 42

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN159

<400> 42

tccatatgcg ctcccttctc tgacgcgct 29

<210> 43

<211> 80

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer NNde1

<400> 43

tatgggccat caccatcacc atcacgccat gggaattcta cgtagcggcc gcggatccaa 60  
gcttagatct cgaggatgaa 80

<210> 44

<211> 82

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer NNde2

<400> 44

ctagttcatc ctcgagatct aagcttggat ccgcggccgc tacgtagaat tcccatggcg 60  
tgatggtgat ggtgatggcc ca 82

<210> 45

<211> 71

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer CNde1

<400> 45

tatgggaatt ctacgtagcg gccgcggatc caagcttaga tctcgaggac atcaccatca 60  
ccatcactga a 71

<210> 46

<211> 73

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer CNde2

<400> 46

ctagttcagt gatggtgatg gtgatgtcct cgagatctaa gcttggatcc gcgccgcta 60  
cgtagaattc cca 73

<210> 47

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN160

<400> 47

aacatatgta tatctccttc ttaaagttaa ac 32

<210> 48

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN343

<400> 48

aaactagttc agtgatggtg atggtgatgc tcgagagatc t

41

<210> 49

<211> 8166

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:vector pTip-NH1

<400> 49

gagctcgacc gcgcgggtcc cggacgggga agagcgggga gctttgccag agagcgacga 60  
 cttccccttg cgttggtgat tgccggtcag ggcagccatc cgccatcgtc gcgtaggggtg 120  
 tcacacccca ggaatcgct cactgaacac agcagccggt aggacgacca tgactgagtt 180  
 ggacaccatc gcaaatccgt ccgatcccgc ggtgcagcgg atcatcgatg tcaccaagcc 240  
 gtcacgatcc aacataaaga caacgttgat cgaggacgtc gagcccctca tgcacagcat 300  
 cgcggccggg gtggagttca tcgaggtcta cggcagcgac agcagtcctt ttccatctga 360  
 gttgctggat ctgtgcgggc ggcagaacat accggtccgc ctcatcgact cctcgatcgt 420  
 caaccagttg ttcaaggggg agcgggaaggc caagacattc ggcatcgccc gcgtccctcg 480  
 cccggccagg ttcggcgata tcgcgagccg gcgtggggac gtcgtcgttc tcgacgggggt 540  
 gaagatcgtc gggaacatcg gcgcgatagt acgcacgtcg ctgcgctcg gagcgctcggg 600  
 gatcatcctg gtggacagtg acatcaccag catcgcgga cggcgtctcc aaagggccag 660  
 ccgaggttac gtcttctccc ttcccgctgt tctctccggt cgcgaggagg ccatcgccctt 720  
 cattcgggac agcggtatgc agctgatgac gctcaaggcg gatggcgaca tttccgtgaa 780  
 ggaactcggg gacaatccgg atcggtggc cttgctgttc ggcagcgaaa aggggtgggcc 840

ttccgacctg ttccgaggagg cgtcttccgc ctcggtttcc atcccatga tgagccagac 900  
cgagtctctc aacgtttccg tttccctcgg aatcgcgctg cacgagagga tcgacaggaa 960  
tctcgcggcc aaccgataag cgcctctgtt cctcggacgc tcggttcctc gacctcgatt 1020  
cgtcagtgat gatcacctca cacggcagcg atcaccactg acatatcgag gtcaacggtc 1080  
gtgggtccggg cgggcactcc tcgaaggcgc ggccgacgcc cttgaacgac tcgatgactc 1140  
tagagtaacg ggctactccg tttaacggac cccgtttctca cgcttttaggc ttgaccccg 1200  
agcctgcatg gggcattccg ccgtgaacct ggtggaatgc ccccggcacc cgggctttcc 1260  
agcaaagatc acctggcgcc gatgagtaag gcgtacagaa ccaactccaca ggaggaccgt 1320  
cgagatgaaa tctaacaatg cgctcatcgt catcctcggc accgtcacc cggatgctgt 1380  
aggcataggc ttggttatgc cggctactgcc gggcctcttg cgggatatcg tccattccga 1440  
cagcatcgcc agtcactatg gcgtgctgct agcgtatat gcgttgatgc aatttctatg 1500  
cgcacccgtt ctcggagcac tgtccgaccg ctttgccgc cgcccagtc tgctcgcttc 1560  
gctacttgga gccactatcg actacgcgat catggcgacc acaccgctc tgtggattct 1620  
ctacgccgga cgcacgtgg ccggcatcac cggcgccaca ggtgcggttg ctggcgcccta 1680  
tatcgccgac atcaccgatg gggaagatcg ggctcgccac ttcgggctca tgagcgcttg 1740  
tttcggcgtg ggtatgggtg caggccccgt ggccggggga ctgttggcg ccatctcctt 1800  
gcatgcacca ttccttgcg cggcggtgct caacggcctc aacctactac tgggctgctt 1860  
cctaatagcag gagtcgcata agggagagcg tcgtccgatg cccttgagag cttcaacct 1920  
agtcagctcc ttccggtgg cggggggcat gactatcgtc gccgcactta tgactgtctt 1980  
ctttatcatg caactcgtag gacagggtgcc ggcagcgctc tgggtcattt tcggcgagga 2040  
ccgctttcgc tggagcgca cgatgatcgg cctgtcgctt gcggtattcg gaatcttgca 2100  
cgccctcgct caagccttcg tcaactggctc cgccacaaa cgtttcggcg agaagcaggc 2160  
cattatcgcc ggcattggcg ccgacgcgt gggctacgtc ttgctggcgt tcgcgacgcg 2220  
aggctggatg gccttcccca ttatgattct tctcgcttcc ggcgcatcg ggatgccgcg 2280  
gttgaggcc atgctgtcca ggcaggtaga tgacgacct caggacagc ttcaaggatc 2340  
gctcgcggt cttaccagcc taacttcgat cattggaccg ctgatcgta cggcgattta 2400  
tgccgcctcg gcgagcacat ggaacgggtt ggcatggatt gtaggcgccg ccctatacct 2460  
tgtctgcctc cccgcgttgc gtcgcggtgc atggagccgg gccacctga cctgaatgga 2520  
agccggcggc acctcgctaa cggattcacc actccaagaa ttggagccaa tcaattcttg 2580  
cggagaactg tgaatgcga aaccaaccct tggcagaaca tatccatcg gtcgccatc 2640



tccagcagcc gcacgcggcg catctcgggc agcgttgggt cctggccacg ggtgcgcatg 2700  
atcgtgctcc tgtcgttgag gactagaatt gatctcctcg accgccaatt gggcatctga 2760  
gaatcatctg cgtttctcgc acgcaacgta cttgcaacgt tgcaactcct agtgttgtga 2820  
atcacacccc accgggggggt gggattgcag tcaccgattt ggtgggtgcg cccaggaaga 2880  
tcacgtttac ataggagctt gcaatgagct actccgtggg acaggtggcc ggcttcgccg 2940  
gagtgcgggt gcgcacgctg caccactacg acgacatcgg cctgctcgtg ccgagcgagc 3000  
gcagccacgc gggccaccgg cgctacagcg acgccgacct cgaccggctg cagcagatcc 3060  
tgttctaccg ggagctgggc ttcccgtcgc acgaggtcgc cgccctgctc gacgaccggg 3120  
ccgcggaccc gcgcgcgcac ctgcgccgcc agcacgagct gctgtccgcc cggatcggga 3180  
aactgcagaa gatggcggcg gccgtggagc aggcgatgga ggcacgcagc atgggaatca 3240  
acctcacccc ggaggagaag ttcgaggtct tcggcgactt cgaccccgac cagtacgagg 3300  
aggaggtccg ggaacgctgg gggaacaccg acgcctaccg ccagtccaag gagaagaccg 3360  
cctcgtacac caaggaggac tggcagcgca tccaggacga ggccgacgag ctcaccggcg 3420  
gcttcgtcgc cctgatggac gcgggtgagc ccgccgactc cgagggggcg atggacgccg 3480  
ccgaggacca ccggcagggc atcgcccgca accactacga ctgcgggtac gagatgcaca 3540  
cctgcctggg cgagatgtac gtgtccgacg aacgtttcac gcgaaacatc gacgccgcca 3600  
agccgggcct cgccgcctac atgcgcgacg cgatcctcgc caacgccgtc cggcacaccc 3660  
cctgagcgggt ggtcgtggcc cgggtctccc gcccggtctc accccacggc tcaactccgg 3720  
gccacgacca ccgccgtccc gtacgcgcac acctcggtgc ccacgtccgc cgctccgtc 3780  
acgtcgaaac ggaagatccc cgggtaccga gctcgtcagg tggcactttt cggggaaatg 3840  
tgcgcggaac ccctatttgt ttatttttct aaatacatc aaatatgtat ccgctcatga 3900  
gacaataacc ctgataaatg cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac 3960  
atttcctgtg cgcccttatt cccttttttg cggcattttg ccttcctgtt tttgctcacc 4020  
cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt ggggtgcacga gtgggttaca 4080  
tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc 4140  
caatgatgag cacttttaaa gttctgctat gtggcgcggt attatccgt attgacgccg 4200  
ggcaagagca actcggtcgc cgcatacact attctcagaa tgacttggtt gagtactcac 4260  
cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgcc 4320  
taaccatgag tgataacact gcggccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg 4380  
agctaaccgc ttttttgac aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaac 4440

cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg 4500  
caacaacgtt gcgcaaacta ttaactggcg aactacttac tctagcttec cggcaacaat 4560  
taatagactg gatggaggcg gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg 4620  
ctggctgggt tattgctgat aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg 4680  
cagcactggg gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc 4740  
aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc 4800  
attggtaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt 4860  
tttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt 4920  
aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt 4980  
gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaacca ccgctaccag 5040  
cgggtggtttg ttgcccggat caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca 5100  
gcagagcgca gataccaaat actgttcttc tagtgtagcc gtagttaggc caccacttca 5160  
agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgctaata cctgttacca gtggctgctg 5220  
ccagtggcga taagtctgtg cttaccgggt tggactcaag acgatatgta ccggataagg 5280  
cgcagcggtc gggctgaacg gggggttcgt gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct 5340  
acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga 5400  
gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc 5460  
ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg 5520  
agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg 5580  
cggccttttt acggttcctg gccttttgct ggccttttgc tcacatgttc tttcctgcgt 5640  
tatcccctga ttctgtggat aaccgtatta ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc 5700  
gcagccgaac gaccgagcgc agcgagtcag tgagcgagga agcggaagag cgccaatac 5760  
gcaaaccgcc tctccccgcg cgttggccga ttcattaatg cagctggcac gactagagtc 5820  
ccgctgaggc ggcgtagcag gtcagccgcc ccagcgggtg tcaccaaccg ggggtggaacg 5880  
gcgccggtat cgggtgtgtc cgtggcgctc attccaacct ccgtgtgttt gtgcaggttt 5940  
cgcgtgttgc agtccctcgc accggcaccc gcagcgaggg gctcacgggt gccgggtgggt 6000  
cgactagttc atcctcgaga tctaagcttg gatccgcggc cgctacgtag aattcccata 6060  
tggtgatggg gatgggtggc catggccgct cccttctctg acgccgtcca cgctgcctcc 6120  
tcacgtgacg tgagggtgaa gcccggaagt tccgcgtgcc acgccgtgag ccgccgcgtg 6180  
ccgtcggctc cctcagcccg ggcggccgtg ggagcccgcc tcgatatgta caccgagaa 6240

gctcccagcg tcctcctggg ccgcgatact cgaccaccac gcacgcacac cgcactaacg 6300  
attcgggccgg cgctcgattc ggccggcgct cgattcggcc ggcgctcgat tcggccggcg 6360  
ctcgattcgg ccggcgctcg attcgggcga gcagaagagt gaacaaccac cgaccacgct 6420  
tccgctctgc gcgccgtacc cgacctacct cccgcagctc gaagcagctc ccgggagtac 6480  
cgccgtactc acccgctgt gtcaccatc caccgacgca aagcccaacc cgagcacacc 6540  
tcttgacca aggtgccgac cgtggctttc cgctcgcagg gttccagaag aaatcgaacg 6600  
atccagcgcg gcaaggttca aaaagcaggg gttggtgggg aggaggtttt ggggggtgtc 6660  
gccgggatac ctgatatggc tttgttttgc gtagtcgaat aattttccat atagcctcgg 6720  
cgcgctcggac tcgaatagtt gatgtgggcg ggcacagttg ccccatgaaa tccgcaacgg 6780  
ggggcggtgct gagcgatcgg caatgggagg atgcggtgtt gcttcgcac cgcccggttcg 6840  
cgacgaacaa cctccaacga ggtcagtacc ggatgagccg cgacgacgca ttggcaatgc 6900  
ggtacgtcga gcattcaccg cacgcgttgc tcggatctat cgtcatcgac tgcgatcacg 6960  
ttgacgccgc gatgcgcgca ttcgagcaac catccgacca tccggcgccg aactgggtcg 7020  
cacaatgcc gtccggccgc gcacacatcg gatggtggct cggccccaac cacgtgtgcc 7080  
gcaccgacag cgcccgactg acgccactgc gctacgcca ccgcatcgaa accggcctca 7140  
agatcagcgt cggcgggcgat ttcgcgtatg gcgggcaact gacaaaaaac ccgattcacc 7200  
ccgattggga gacgatctac ggcccgcca cccgtacac attgcggcag ctggccacca 7260  
tccacacacc ccggcagatg ccgcgtcggc ccgatcgggc cgtgggcctg ggccgcaacg 7320  
tcaccatgtt cgacgccacc cggcgatggg cataccgca gtggtggcaa caccgaaacg 7380  
gaaccggccg cgactgggac catctcgtcc tgcagcactg ccacgccgtc aacaccgagt 7440  
tcacgacacc actgccgttc accgaagtac gcgccaccgc gcaatccatc tccaaatgga 7500  
tctggcgcaa tttcaccgaa gaacagtacc gagcccgaca agcgcattc ggtcaaaaag 7560  
gcggcaaggc aacgacactc gccaaacaag aagccgtccg aaacaatgca agaaagtacg 7620  
acgaacatac gatgcgagag gcgattatct gatgggcgga gccaaaaatc cgggtgcgccg 7680  
aaagatgacg gcagcagcag cagccgaaaa attcggtgcc tccactcgca caatccaacg 7740  
cttgtttgct gagccgcgtg acgattacct cggccgtgcg aaagctcgcc gtgacaaagc 7800  
tgtcgagctg cggaagcagg ggttgaagta ccgggaaatc gccgaagcga tggaactctc 7860  
gaccgggatc gtcggccgat tactgcacga ccccgagcagg cacggcgaga tttcagcgga 7920  
ggatctgtcg gcgtaaccaa gtcagcgggt tgtcgggttc cggccggcgc tcggcactcg 7980  
gaccggccgg cggatggtgt tctgcctctg gcgcagcgtc agctaccgcc gaaggcctgt 8040

catcgaccgg cttcgactga agtatgagca acgtcacagc ctgtgattgg atgatccgct 8100  
cacgctcgac cgctacctgt tcagctgccg cccgctgggc atgagcaacg gccaaactctc 8160  
gttcaa 8166

<210> 50

<211> 8169

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:vector pTip-NH2

<400> 50

gagctcgacc gcgcgggtcc cggacgggga agagcgggga gctttgccag agagcgacga 60  
cttccccttg cgttggtgat tgccggtcag ggcagccatc cgccatcgtc gcgtaggggtg 120  
tcacacccca ggaatcgctg cactgaacac agcagccggt aggacgacca tgactgagtt 180  
ggacaccatc gcaaatacgt ccgatcccgc ggtgcagcgg atcatcgatg tcaccaagcc 240  
gtcacgatcc aacataaaga caacgttgat cgaggacgtc gagcccctca tgcacagcat 300  
cgcgcccggg gtggagttca tcgaggtcta cggcagcgac agcagtcctt ttccatctga 360  
gttgctggat ctgtgcgggc ggcagaacat accggtccgc ctcatcgact cctcgatcgt 420  
caaccagttg ttcaaggggg agcgggaaggc caagacattc ggcatcgccc gcgtccctcg 480  
cccggccagg ttccggcgata tcgcgagccg gcgtggggac gtcgtcgttc tcgacggggt 540  
gaagatcgtc gggaacatcg gcgcgatagt acgcacgtcg ctgcgctcg gagcgtcggg 600  
gatcatcctg gtggacagtg acatcaccag catcgcgagc cggcgtctcc aaagggccag 660  
ccgaggttac gtctttctcc ttcccgctgt tctctccggt cgcgaggagg ccatcgctt 720  
cattcgggac agcgggtatgc agctgatgac gctcaaggcg gatggcgaca tttccgtgaa 780  
ggaactcggg gacaatccgg atcggctggc cttgctgttc ggcagcgaaa aggggtgggccc 840  
ttccgacctg ttccgaggagg cgtcttccgc ctcggtttcc atcccatga tgagccagac 900  
cgagtctctc aacgtttccg tttccctcgg aatcgcgctg cacgagagga tcgacaggaa 960  
tctcgcggcc aaccgataag cgcctctgtt cctcggacgc tcggttctc gacctcgatt 1020

cgtcagtgat gatcacctca cacggcagcg atcaccactg acatatcgag gtcaacggtc 1080  
gtggtcggg cgggcactcc tcgaaggcgc ggccgacgcc cttgaacgac tcgatgactc 1140  
tagagtaacg ggctactccg tttaacggac ccggttctca cgctttaggc ttgaccccg 1200  
agcctgcatg gggcattccg ccgtgaaccc ggtggaatgc ccccggcacc cgggctttcc 1260  
agcaaagatc acctggcgcc gatgagtaag gcgtacagaa ccaactccaca ggaggaccgt 1320  
cgagatgaaa tctaacaatg cgctcatcgt catcctcggc accgtcacc tggatgctgt 1380  
aggcataggc ttggttatgc cggctactgcc gggcctcttg cgggatatcg tccattccga 1440  
cagcatcgcc agtcactatg gcgtgctgct agcgctatat gcgttgatgc aattttctatg 1500  
cgcacccgtt ctcgagacac tgtccgaccg ctttggccgc cgcccagtcc tgctcgcttc 1560  
gctacttgga gccactatcg actacgcgat catggcgacc acaccgtcc tgtggattct 1620  
ctacgccgga cgcctcgttg ccggcatcac cggcgccaca ggtgcggttg ctggcgcccta 1680  
tatcgccgac atcaccgatg gggaagatcg ggctcgccac ttcgggctca tgagcgcttg 1740  
tttcggcgtg ggtatggtg caggccccgt ggccggggga ctggtggcg ccatctcctt 1800  
gcatgcacca ttccttgccg cggcggtgct caacggcctc aacctactac tgggctgctt 1860  
cctaattgcag gattcgcata agggagagcg tcgtccgatg cccttgagag ccttcaacc 1920  
agtcagctcc ttccggtggg cgcggggcat gactatcgtc gccgcactta tgactgtctt 1980  
ctttatcatg caactcgtag gacaggcgcc ggcagcgctc tgggtcattt tcggcgagga 2040  
ccgctttcgc tggagcgga cgatgatcgg cctgtcgctt gcggtattcg gaatcttgca 2100  
cgccctcgct caagccttcg tcaactggctc cgccacaaa cgtttcggcg agaagcaggc 2160  
cattatcgcc ggcatggcg cgcagcgct gggctacgtc ttgctggcgt tcgcgacgcg 2220  
aggctggatg gccttccca ttatgattct tctcgcttcc ggcggcatcg ggatgccgc 2280  
gttgaggcc atgctgtcca ggcaggtaga tgacgacat caggacagc ttcaaggatc 2340  
gctcgcggt cttaccagcc taacttcgat cattggaccg ctgatcgtca cggcgattta 2400  
tgccgcctcg gcgagcacat ggaacgggtt ggcatggatt gtaggcgccg ccctatacct 2460  
tgtctgcctc ccgcggttc gtcgcggtgc atggagccg gccacctga cctgaatgga 2520  
agccggcggc acctcgctaa cggattcacc actccaagaa ttggagcaa tcaattcttg 2580  
cggagaactg tgaatgcga aaccaaccct tggcagaaca tatccatcg gtccgccatc 2640  
tccagcagcc gcacgcggcg catctcgggc agcgttgggt cctggccacg ggtgcgcatg 2700  
atcgtgctcc tgtcgttgag gactagaatt gatctcctcg accgccaatt gggcatctga 2760  
gaatcatctg cgtttctcgc acgcaacgta cttgcaacgt tgcaactcct agtgttggtga 2820

atcacacccc accggggggt gggattgcag tcaccgattt ggtgggtgcg cccaggaaga 2880  
tcacgttttac ataggagctt gcaatgagct actccgtggg acaggtggcc ggcttcgccg 2940  
gagtgcagggt gcgcacgctg caccactacg acgacatcgg cctgctcgta ccgagcgagc 3000  
gcagccacgc gggccaccgg cgctacagcg acgccgacct cgaccggctg cagcagatcc 3060  
tgttctaccg ggagctgggc ttcccgtcgc acgaggtcgc cgccctgctc gacgaccgg 3120  
ccgcggaccc gcgcgcgcac ctgcgccgcc agcacgagct gctgtccgcc cggatcggga 3180  
aactgcagaa gatggcggcg gccgtggagc aggcgatgga ggcacgcagc atgggaatca 3240  
acctcacccc ggaggagaag ttcgaggtct tcggcgactt cgaccccgac cagtacgagg 3300  
aggaggtccg ggaacgctgg gggaacaccg acgcctaccg ccagtccaag gagaagaccg 3360  
cctcgtacac caaggaggac tggcagcgca tccaggacga ggccgacgag ctcacccggc 3420  
gcttcgtcgc cctgatggac gcgggtgagc ccgccgactc cgagggggcg atggacgccg 3480  
ccgaggacca ccggcagggc atgcgccgca accactacga ctgcgggtac gagatgcaca 3540  
cctgcctggg cgagatgtac gtgtccgacg aacgtttcac gcgaaacatc gacgccgcca 3600  
agccgggcct cgccgcctac atgcgcgacg cgatcctcgc caacgccgtc cggcacaccc 3660  
cctgagcgggt ggtcgtggcc cgggtctccc gcccggtctc accccacggc tcaactccgg 3720  
gccacgacca ccgccgtccc gtacgcgcac acctcggtgc ccacgtccgc cgcctccgtc 3780  
acgtcgaaac ggaagatccc cgggtaccga gctcgtcagg tggcactttt cggggaaatg 3840  
tgcgcggaac ccctatttgt ttatTTTTct aaatacatc aaatatgtat ccgctcatga 3900  
gacaataacc ctgataaatg cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac 3960  
atttcctgtg cgcccttatt ccctTTTTtg cggcattttg ccttcctggt tttgctcacc 4020  
cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt ggggtgcagc gtgggttaca 4080  
tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc 4140  
caatgatgag cactttttaa gttctgctat gtggcgcggt attatcccgt attgacgccg 4200  
ggcaagagca actcggtcgc cgcatacact attctcagaa tgacttggtt gagtactcac 4260  
cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgtgccca 4320  
taaccatgag tgataacact gcggccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg 4380  
agctaaccgc ttttttgcac aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cgttggggaa 4440  
cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg 4500  
caacaacggt gcgcaaacta ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat 4560  
taatagactg gatggaggcg gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gcccttcgg 4620

ctggctggtt tattgctgat aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg 4680  
cagcactggg gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc 4740  
aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc 4800  
attggtaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt 4860  
tttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt 4920  
aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt 4980  
gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaacca ccgctaccag 5040  
cgggtggttg tttgccggat caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca 5100  
gcagagcgca gataccaaat actgttcttc tagtgtagcc gtagttaggc caccatttca 5160  
agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgctaata cctgttacca gtggctgctg 5220  
ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt tggactcaag acgatagtta ccggataagg 5280  
cgcagcggtc gggctgaacg ggggggttcgt gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct 5340  
acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaaag cgccacgctt cccgaaggga 5400  
gaaaggcgga caggatatccg gtaagcggca gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc 5460  
ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg 5520  
agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggccggagcct atggaaaaac gccagcaacg 5580  
cggccttttt acggttctg gccttttctg ggccttttgc tcacatgttc tttctgcgt 5640  
tatccctga ttctgtggat aaccgtatta ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc 5700  
gcagccgaac gaccgagcgc agcgagtcag tgagcgagga agcggaagag cgccaatac 5760  
gcaaaccgcc tctccccgcg cgttggccga ttcattaatg cagctggcac gactagagtc 5820  
ccgctgaggc ggcgtagcag gtcagccgcc ccagcgggtg tcaccaaccg ggggtggaacg 5880  
gcgccggtat cgggtgtgtc cgtggcgctc attccaacct ccgtgtgttt gtgcaggttt 5940  
cgcgtgttgc agtccctcgc accggcaccc gcagcgaggg gctcacgggt gccgggtgggt 6000  
cgactagtgc atcctcgaga tctaagcttg gatccgcggc cgctacgtag aattcccatg 6060  
gcgtgatggt gatggtgatg gcccatatgc gctcccttct ctgacgccgt ccacgctgcc 6120  
tcctcacgtg acgtgaggtg caagcccga cgttccgcgt gccacgccgt gagccgccgc 6180  
gtgccgtcgg ctccctcagc ccgggcggcc gtgggagccc gcctcgatat gtacaccga 6240  
gaagctccca gcgtcctcct gggccgcgat actcgaccac cacgcacgca caccgcacta 6300  
acgattcggc cggcgctcga ttccggccgc gctcgattcg gccggcgctc gattcggccg 6360  
gcgctcgatt cggccggcgc tcgattcggc cgagcagaag agtgaacaac caccgaccac 6420

gcttccgctc tgcgcgccgt acccgacctt cctcccgagc ctccaagcag ctcccgaggag 6480  
 taccgccgta ctcacccgcc tgtgtcacc atccaccgac gcaaagccoa acccgagcac 6540  
 acctcttgca ccaaggtgcc gaccgtggct ttccgctcgc agggttccag aagaaatcga 6600  
 acgatccagc gcggcaaggt tcaaaaagca ggggttggtg gggaggagggt tttgggggggt 6660  
 gtcgccggga tacctgatat ggctttgttt tgcgtagtcg aataattttc catatagcct 6720  
 cggcgcgtcg gactcgaata gttgatgtgg gcgggcacag ttgccccatg aaatccgcaa 6780  
 cggggggcgt gctgagcgat cggcaatggg cggatgcggt gttgcttccg caccggccgt 6840  
 tcgcgacgaa caacctccaa cgaggtcagt accggatgag ccgcgacgac gcattggcaa 6900  
 tgcggtacgt cgagcattca ccgcacgcgt tgctcggatc tatcgtcatc gactgcgac 6960  
 acgttgacgc cgcgatgcgc gcattcgagc aaccatccga ccatccggcg ccgaactggg 7020  
 tcgcacaatc gccgtccggc cgcgcacaca tcggatggtg gctcggcccc aaccacgtgt 7080  
 gccgcaccga cagcgcgccga ctgacgccac tgcgctacgc ccaccgcac gaaaccggcc 7140  
 tcaagatcag cgtcggcggc gatttcgcgt atggcgggca actgacaaaa aacccgattc 7200  
 accccgattg ggagacgac tacggcccg ccaccccgta cacattgcgg cagctggcca 7260  
 ccatccacac accccggcag atgccgcgtc ggcccgatcg ggccgtgggc ctgggcccga 7320  
 acgtcaccat gttcgacgcc acccggcgat gggcataccc gcagtgggtg caacaccgaa 7380  
 acggaaccgg ccgcgactgg gaccatctcg tcctgcagca ctgccacgcc gtcaacaccg 7440  
 agttcacgac accactgccg ttcaccgaag tacgcgccac cgcgcaatcc atctccaaat 7500  
 ggatctggcg caatttcacc gaagaacagt accgagcccg acaagcgcat ctcggtcaaa 7560  
 aaggcggcaa ggcaacgaca ctgcctaaac aagaagccgt ccgaaacaat gcaagaaagt 7620  
 acgacgaaca tacgatgcga gaggcgatta tctgatgggc ggagccaaaa atccggtgcg 7680  
 ccgaaagatg acggcagcag cagcagccga aaaattcggt gcctccactc gcacaatcca 7740  
 acgcttggtt gctgagccgc gtgacgatta cctcggccgt gcgaaagctc gccgtgacaa 7800  
 agctgtcgag ctgcggaagc aggggttgaa gtaccgggaa atcgccgaag cgatggaact 7860  
 ctcgaccggg atcgtcggcc gattactgca cgacgccgc aggcacggcg agatttcagc 7920  
 ggaggatctg tcggcgtaac caagtcagcg ggttgctggg ttccggccgg cgctcggcac 7980  
 tcggaccggc cggcggtatg tgttctgcct ctggcgcagc gtcagctacc gccgaaggcc 8040  
 tgtcatcgac cggcttcgac tgaagtatga gcaacgtcac agcctgtgat tggatgatcc 8100  
 gctcaacgctc gaccgctacc tgttcagctg ccgcccgctg ggcatgagca acggccaact 8160  
 ctcggttcaa 8169



<210> 51

<211> 8160

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:vector pTip-CH1

<400> 51

gagctcgacc gcgcgggtcc cggacgggga agagcgggga gctttgccag agagcgacga 60  
cttccccttg cgttggtgat tgccggtcag ggcagccatc cgccatcgtc gcgtaggggtg 120  
tcacacccca ggaatcgct cactgaacac agcagccggt aggacgacca tgactgagtt 180  
ggacaccatc gcaaatcctg ccgatcccgc ggtgcagcgg atcatcgatg tcaccaagcc 240  
gtcacgatcc aacataaaga caacgttgat cgaggacgtc gagccctca tgcacagcat 300  
cgcgggccggg gtggagttca tcgaggtcta cggcagcgac agcagtcctt ttccatctga 360  
gttgctggat ctgtgcgggc ggcagaacat accggtccgc ctcatcgact cctcgatcgt 420  
caaccagttg ttcaaggggg agcgggaaggc caagacattc ggcatcgccc gcgtccctcg 480  
cccggccagg ttcggcgata tcgcgagccg gcgtggggac gtcgtcgttc tcgacgggggt 540  
gaagatcgtc gggaacatcg gcgcgatagt acgcacgtcg ctgcgcctcg gagcgtcggg 600  
gatcatcctg gtggacagtg acatcaccag catcgccgac cggcgtctcc aaagggccag 660  
ccgaggttac gtcttctccc ttcccgctgt tctctccggt cgcgaggagg ccatcgctt 720  
cattcgggac agcggtatgc agctgatgac gctcaaggcg gatggcgaca tttccgtgaa 780  
ggaactcggg gacaatcgg atcggctggc cttgctgttc ggcagcgaaa aggggtgggcc 840  
ttccgacctg ttcgaggagg cgtcttccgc ctcggtttcc atcccatga tgagccagac 900  
cgagtctctc aacgtttccg tttccctcgg aatcgcgctg cacgagagga tcgacaggaa 960  
tctcgcggcc aaccgataag cgcctctgtt cctcggacgc tcggttctc gacctcgatt 1020  
cgtcagtgat gatcacctca cacggcagcg atcaccactg acatatcgag gtcaacggtc 1080  
gtggtcggg cgggcactcc tcgaaggcgc ggccgacgcc cttgaacgac tcgatgactc 1140  
tagagtaacg ggctactccg tttaacggac ccggttctca cgctttaggc ttgaccccg 1200

agcctgcatg gggcattccg ccgtgaaccc ggtggaatgc ccccggcacc cgggctttcc 1260  
agcaaagatc acctggcgcc gatgagtaag gcgtacagaa ccaactccaa ggaggaccgt 1320  
cgagatgaaa tctaacaatg cgctcatcgt catcctcggc accgtcacc tggatgctgt 1380  
aggcataggc ttggttatgc cgg tactgcc gggcctcttg cgggatatcg tccattccga 1440  
cagcatcgcc agtcactatg gcgtgctgct agcgctatat gcgttgatgc aatttctatg 1500  
cgcacccgtt ctcgagcac tgtccgaccg ctttgccgc cggccagtc tgcctgcttc 1560  
gctacttgga gccactatcg actacgcgat catggcgacc acaccgtcc tgtggattct 1620  
ctacgccgga cgcacgtg cggcatcac cggcgccaca ggtgcggtg ctggcgcta 1680  
tatcgccgac atcaccgatg gggaagatgc ggctcgccac ttggggctca tgagcgctg 1740  
tttcggcgtg ggtatggtg caggccccgt ggccggggga ctgttggcg ccatctcctt 1800  
gcatgcacca ttccttgccg cggcggtgct caacggcctc aacctactac tgggctgctt 1860  
ccta atgcag gagtgcata agggagagcg tcgtccgat cccttgagag ccttcaacc 1920  
agtcagctcc ttccggtggg cgcggggcat gactatcgt gccgcactta tgactgtctt 1980  
ctttatcatg caactcgtag gacaggtgcc ggcagcgctc tgggtcattt tcggcgagga 2040  
ccgctttcgc tggagcgca cgatgatcgg cctgtcgctt gcggtattcg gaatcttgca 2100  
cgccctcgt caagccttcg tctactggtc gccacaaa cgtttcggcg agaagcaggc 2160  
cattatgcc ggcatggcg ccgacgcgt gggctacgtc ttgctggcgt tcgcgacgcg 2220  
aggctggatg gccttcccc ttatgattct tctcgcttc gccggcatcg ggatgccgc 2280  
gttgacaggc atgctgtcca ggcaggtaga tgacgacct caggacagc ttcaaggatc 2340  
gctcgcggt cttaccagc taacttcgat cattggaccg ctgatcgtc cggcgattta 2400  
tgccgcctc gcgagcacat ggaacgggtt ggcatggatt gtaggcgcg ccctatacct 2460  
tgtctgcct cccgcgttg gtcgcggtg atggagccg gccacctga cctgaatgga 2520  
agccggcggc acctcgctaa cggattcacc actccaagaa ttggagcaa tcaattcttg 2580  
cggagaactg tgaatgcga aaccaacct tggcagaaca tatccatcg gcccgcatc 2640  
tccagcagc gcacgcggc catctcgggc agcgttgggt cctggccacg ggtgcgcatg 2700  
atcgtgctc tgcgttgag gactagaatt gatctcctc accgcaatt gggcatctga 2760  
gaatcatct cgtttctgc acgcaacgta cttgcaacgt tgcaactcct agtggtgtga 2820  
atcacacccc accgggggt gggattgcag tcaccgattt ggtgggtgcg ccaggaaga 2880  
tcacgtttac ataggagctt gcaatgagct actccgtggg acaggtggc ggcttcgccg 2940  
gagtgcggt gcgcacgct caccactac acgacatcg cctgctcgta ccgagcgagc 3000

gcagccacgc gggccaccgg cgctacagcg acgccgacct cgaccggctg cagcagatcc 3060  
tgttctaccg ggagctgggc ttcccgctcg acgaggctcg cgccctgctc gacgaccgg 3120  
ccgcggaacc gcgcgcgcac ctgcgcgcgc agcacgagct gctgtccgcc cggatcggga 3180  
aactgcagaa gatggcggcg gccgtggagc aggcgatgga ggcacgcagc atgggaatca 3240  
acctaccccc ggaggagaag ttcgaggtct tcggcgactt cgaccccgac cagtacgagg 3300  
aggaggtccg ggaacgctgg gggaacaccg acgcctaccg ccagtccaag gagaagaccg 3360  
cctcgtacac caaggaggac tggcagcgca tccaggacga ggccgacgag ctcaccggc 3420  
gcttcgtcgc cctgatggac gcgggtgagc ccgccgactc cgagggggcg atggacgccg 3480  
ccgaggacca ccggcagggc atcgcccgca accactacga ctgcgggtac gagatgcaca 3540  
cctgcctggg cgagatgtac gtgtccgacg aacgtttcac gcgaaacatc gacgccgcca 3600  
agccgggcct cgccgcctac atgcgcgacg cgatcctcgc caacgccgtc cggcacaccc 3660  
cctgagcggg ggtcgtggcc cgggtctccc gcccggtctc accccacggc tactcccgg 3720  
gccacgacca ccgccgtccc gtacgcgcac acctcgggtg ccacgtccgc cgcctccgtc 3780  
acgtcgaaac ggaagatccc cgggtaccga gctcgtcagg tggcactttt cggggaaatg 3840  
tgccgcggaac ccctatttgt ttatttttct aaatacattc aaatatgtat ccgctcatga 3900  
gacaataacc ctgataaatg cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac 3960  
atttccgtgt cgcccttatt cccttttttg cggcattttg ccttcctggt tttgctcacc 4020  
cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt ggggtgcacga gtgggttaca 4080  
tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc 4140  
caatgatgag cactttttaa gttctgctat gtggcgcggt attatcccgt attgacgccg 4200  
ggcaagagca actcggctgc cgcatacact attctcagaa tgacttggtt gactactcac 4260  
cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca 4320  
taaccatgag tgataaact gcggccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg 4380  
agctaaccgc ttttttgac aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaaac 4440  
cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg 4500  
caacaacgtt gcgcaaaact ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat 4560  
taatagactg gatggaggcg gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gcccttcgg 4620  
ctggctggtt tattgctgat aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg 4680  
cagcactggg gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc 4740  
aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc 4800

attggttaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt 4860  
tttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt 4920  
aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt 4980  
gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaaacca ccgctaccag 5040  
cgggtggtttg tttgccgat caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca 5100  
gcagagcgca gataccaaat actgttcttc tagtgtagcc gtagttaggc caccacttca 5160  
agaactctgt agcacgcct acatacctcg ctctgctaata cctgttacca gtggctgctg 5220  
ccagtggcga taagtctgtg cttaccgggt tggactcaag acgatatgta ccggataagg 5280  
cgcagcggtc gggctgaacg gggggttcgt gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct 5340  
acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga 5400  
gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc 5460  
ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg 5520  
agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg 5580  
cggccttttt acggttctctg gccttttgct ggccttttgc tcacatgttc tttcctgcgt 5640  
tatccctga ttctgtggat aaccgtatta ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc 5700  
gcagccgaac gaccgagcgc agcagtcag tgagcgagga agcggaagag cgccaatac 5760  
gcaaaccgcc tctccccgcg cgttggccga ttcattaatg cagctggcac gactagagtc 5820  
ccgctgaggc ggcgtagcag gtcagccgcc ccagcgggtg tcaccaaccg ggggtggaacg 5880  
gcgccggtat cgggtgtgtc cgtggcgctc attccaacct ccgtgtgttt gtgcaggttt 5940  
cgcgtgttgc agtccctcgc accggcaccc gcagcgaggg gctcacgggt gccgggtgggt 6000  
cgactagtgc agtgatgggt atgggtgatgt cctcgagatc taagcttgga tccgcggccg 6060  
ctacgtagaa ttcccatggc cgtcccttc tctgacgccg tccacgtgc ctctcacgt 6120  
gacgtgaggt gcaagcccgg acgttccgcg tgccacgccg tgagccgccg cgtgccgtcg 6180  
gctccctcag ccggggcggc cgtgggagcc cgcctcgata tgtacaccg agaagctccc 6240  
agcgtcctcc tggggcgcg tactcgacca ccacgcacgc acaccgact aacgattcgg 6300  
ccggcgctcg attcggccgg cgtcgtatc ggccggcgct cgattcggcc ggcgctcgat 6360  
tcggccggcg ctcgattcgg ccgagcagaa gagtgaacaa ccaccgacca cgcttccgct 6420  
ctgcgcgccg taccgacct acctcccgca gctcgaagca gctcccggga gtaccgccgt 6480  
actcaccgc ctgtgtcac catccaccga cgcaaagccc aaccgagca cacctcttgc 6540  
accaaggtgc cgaccgtggc tttccgctcg cagggttcca gaagaaatcg aacgatccag 6600

cgcggaagg ttcaaaaagc aggggttggt ggggaggagg ttttgggggg tgctgccggg 6660  
atacctgata tggctttgtt ttgcgtagtc gaataatttt ccatatagcc tcggcgcgctc 6720  
ggactcgaat agttgatgtg ggcgggcaca gttgccccat gaaatccgca acggggggcg 6780  
tgctgagcga tcggcaatgg gcggatgcgg tgttgcttcc gcaccggccg ttcgcgacga 6840  
acaacctcca acgaggtcag taccggatga gccgcgacga cgcattggca atgcggtacg 6900  
tcgagcattc accgcacgcg ttgctcgat ctatcgtcat cgactgcgat cacgttgacg 6960  
ccgcgatgcg cgcattcgag caaccatccg accatccggc gccgaactgg gtcgcacaat 7020  
cgccgtccgg ccgcgcacac atcggatggt ggctcggccc caaccacgtg tgccgcaccg 7080  
acagcgcccg actgacgcca ctgcgctacg cccaccgcat cgaaaccggc ctcaagatca 7140  
gcgtcggcgg cgatttcgcg tatggcgggc aactgaccaa aaaccgatt caccocgatt 7200  
gggagacgat ctacggcccg gccaccccggt acacattgcg gcagctggcc accatccaca 7260  
caccocggca gatgccgcgt cggcccgatc gggccgtggg cctgggcccgc aacgtcacca 7320  
tgttcgacgc caccggcga tgggcatacc cgcagtgggtg gcaacaccga aacggaaccg 7380  
gccgcgactg ggaccatctc gtctgcagc actgccacgc cgtcaacacc gagttcacga 7440  
caccactgcc gttcaccgaa gtacgcgcca ccgcgcaatc catctccaaa tggatctggc 7500  
gcaatttcac cgaagaacag taccgagccc gacaagcgca tctcggtcaa aaaggcggca 7560  
aggcaacgac actcgccaaa caagaagccg tccgaaacaa tgcaagaaag tacgacgaac 7620  
atacgatgcg agaggcgatt atctgatggg cggagccaaa aatccggtgc gccgaaagat 7680  
gacggcagca gcagcagccg aaaaattcgg tgcctccact cgcacaatcc aacgcttggt 7740  
tgctgagccg cgtgacgatt acctcgccg tgcgaaagct cgccgtgaca aagctgtcga 7800  
gctgcggaag caggggttga agtaccggga aatcgccgaa gcgatggaac tctcgaccgg 7860  
gatcgtcggc cgattactgc acgacgccc caggcacggc gagatttcag cggaggatct 7920  
gtcggcgtaa ccaagtcagc gggttgtcgg gttccggccg gcgctcggca ctcggaaccg 7980  
ccggcggatg gtgttctgcc tctggcgcag cgtcagctac cgccgaaggc ctgtcatcga 8040  
ccggcttcga ctgaagtatg agcaacgtca cagcctgtga ttggatgatc cgctcacgct 8100  
cgaccgctac ctgttcagct gccgcccgt gggcatgagc aacggccaac tctcgttcaa 8160

<210> 52

<211> 8160

<212> DNA

## &lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:vector pTip-CH2

&lt;400&gt; 52

gagctcgacc gcgcgggtcc cggacgggga agagcgggga gctttgccag agagcgacga 60  
cttccccttg cgttggtgat tgccggtcag ggcagccatc cgccatcgtc gcgtaggggtg 120  
tcacacccca ggaatcgcgt cactgaacac agcagccggt aggacgacca tgactgagtt 180  
ggacaccatc gcaaatccgt ccgatcccgc ggtgcagcgg atcatcgatg tcaccaagcc 240  
gtcacgatcc aacataaaga caacgttgat cgaggacgtc gagccctca tgcacagcat 300  
cgcggccggg gtggagttca tcgaggtcta cggcagcgac agcagtcctt ttccatctga 360  
gttgctggat ctgtgcgggc ggcagaacat accggtccgc ctcatcgact cctcgatcgt 420  
caaccagttg ttcaaggggg agcggaaggc caagacattc ggcacgccc gcgtccctcg 480  
cccggccagg ttcggcgata tcgcgagccg gcgtggggac gtcgtcgttc tcgacggggt 540  
gaagatcgtc gggaacatcg gcgcgatagt acgcacgtcg ctgcgctcg gagcgtcggg 600  
gatcatcctg gtggacagtg acatcaccag catcgcgac cggcgtctcc aaagggccag 660  
ccgaggttac gtcttctccc ttcccgtcgt tctctccggt cgcgaggagg ccatcgctt 720  
cattcgggac agcggtatgc agctgatgac gctcaaggcg gatggcgaca tttccgtgaa 780  
ggaactcggg gacaatccgg atcggctggc cttgctgttc ggcagcgaaa aggggtgggcc 840  
ttccgacctg ttcgaggagg cgtcttccgc ctcggtttcc atcccatga tgagccagac 900  
cgagtctctc aacgtttccg tttccctcgg aatcgcgctg cacgagagga tcgacaggaa 960  
tctcgcggcc aaccgataag cgcctctggt cctcgagcgc tcggttcctc gacctcgatt 1020  
cgtcagtgat gatcacctca cacggcagcg atcaccactg acatatcgag gtcaacggtc 1080  
gtggtccggg cgggcactcc tcgaaggcgc ggccgacgcc cttgaacgac tcgatgactc 1140  
tagagtaacg ggctactccg tttaacggac cccgttctca cgctttaggc ttgaccccg 1200  
agcctgcatg gggcattccg ccgtgaaccc ggtggaatgc ccccggcacc cgggctttcc 1260  
agcaaagatc acctggcgcc gatgagtaag gcgtacagaa cactccaca ggaggaccgt 1320  
cgagatgaaa tctaacaatg cgctcatcgt catcctcggc accgtcacc tggtatgctgt 1380  
aggcataggc ttggttatgc cgggtactgc gggcctcttg cgggatatcg tccattccga 1440

cagcatcgcc agtcactatg gcgtgctgct agcgctatat gcgttgatgc aattttctatg 1500  
cgcacccgtt ctcgagcac tgtccgaccg ctttggccgc cgcccagtcc tgctcgcttc 1560  
gctacttggga gccactatcg actacgcgat catggcgacc acaccgtcc tgtggattct 1620  
ctacgccgga cgcacgtgg ccggcatcac cggcgccaca ggtgcggttg ctggcgcccta 1680  
tatcgccgac atcacgatg gggaagatcg ggctcgccac ttggggctca tgagcgcttg 1740  
tttcggcgtg ggtatggtgg caggccccgt ggccggggga ctgttggcg ccatctcctt 1800  
gcatgcacca ttccttgcg cggcggtgct caacggcctc aacctactac tgggctgctt 1860  
cctaattgcag gactcgcata agggagagcg tcgtccgatg cccttgagag ccttcaacct 1920  
agtcagctcc ttccggtgg cgcgggcat gactatcgtc gccgcactta tgactgtctt 1980  
ctttatcatg caactcgtag gacaggtgcc ggcagcgctc tgggtcattt tcggcgagga 2040  
ccgctttcgc tggagcgga cgatgatcg cctgtcgctt gcggtattcg gaatcttgca 2100  
cgccctcgct caagccttcg tcaactggtcc cgccaccaa cgtttcggcg agaagcaggc 2160  
cattatcgcc ggcatggcgg ccgacgcgt gggctacgtc ttgctggcgt tcgcgacgcg 2220  
aggctggatg gccttccca ttatgattct tctcgcttcc ggcggcacgc ggatgccgcg 2280  
gttcgagcc atgctgtcca ggcaggtaga tgacgacct caggacagc ttcaaggatc 2340  
gctcgcggt cttaccagcc taacttcgat cattggaccg ctgatcgtca cggcgattta 2400  
tgccgcctcg gcgagcacat ggaacgggtt ggcatggatt gtaggcgcg ccctatacct 2460  
tgtctgcctc ccgcggttc gtcgcggtgc atggagccgg gccacctga cctgaatgga 2520  
agccggcggc acctcgctaa cggattcacc actccaagaa ttggagcaa tcaattcttg 2580  
cggagaactg tgaatgcga aaccaacct tggcagaaca tatccatgc gtccgccatc 2640  
tccagcagcc gcacgcggcg catctcgggc agcgttgggt cctggccacg ggtgcgcatg 2700  
atcgtgctcc tgtcgttgag gactagaatt gatctcctcg accgccaatt gggcatctga 2760  
gaatcatctg cgtttctcgc acgcaacgta cttgcaacgt tgcaactcct agtgttgtga 2820  
atcacacccc accggggggt gggattgcag tcaccgattt ggtgggtgcg ccaggaaga 2880  
tcacgtttac ataggagctt gcaatgagct actccgtggg acaggtggcc ggcttcgcg 2940  
gagtgcggt gcgcacgtg caccactacg acgacatcg cctgctcgta ccgagcgagc 3000  
gcagccacgc gggccaccgg cgctacagcg acgccgacct cgaccggctg cagcagatcc 3060  
tgttctaccg ggagctgggc ttcccgtcg acgaggtcgc cgccctgctc gacgaccgg 3120  
ccgcggaccc gcgcgcgcac ctgcgcgcg agcacgagct gctgtccgcc cggatcggga 3180  
aactgcagaa gatggcggcg gccgtggagc aggcgatgga ggcacgcagc atgggaatca 3240

acctcacccc ggaggagaag ttcgaggtct tcggcgactt cgaccccgac cagtacgagg 3300  
aggaggtccg ggaacgctgg gggaacaccg acgcctaccg ccagtccaag gagaagaccg 3360  
cctcgtacac caaggaggac tggcagcgca tccaggacga ggccgacgag ctcacccggc 3420  
gcttcgtcgc cctgatggac gcgggtgagc ccgccgactc cgagggggcg atggacgccg 3480  
ccgaggacca ccggcagggc atcgcccgca accactacga ctgcgggtac gagatgcaca 3540  
cctgcctggg cgagatgtac gtgtccgacg aacgtttcac gcgaaacatc gacgccgcca 3600  
agccgggcct cgccgcctac atgcgcgacg cgatcctcgc caacgccgtc cggcacaccc 3660  
cctgagcggg gtctgtggcc cgggtctccc gcccggtctc accccacggc tcaactccgg 3720  
gccacgacca ccgccgtccc gtacgcgcac acctcggtgc ccacgtccgc cgcctccgtc 3780  
acgtcgaaac ggaagatccc cgggtaccga gctcgtcagg tggcactttt cggggaaatg 3840  
tgccgcggaac ccctatttgt ttatttttct aaatacatte aaatatgtat ccgctcatga 3900  
gacaataacc ctgataaatg cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac 3960  
atttccgtgt cgcccttatt cccttttttg cggcattttg ccttcctgtt tttgctcacc 4020  
cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt ggggtgcacga gtgggttaca 4080  
tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc 4140  
caatgatgag cactttttaa gttctgctat gtggcgcggt attatcccgt attgacgccg 4200  
ggcaagagca actcggtcgc cgcatacact attctcagaa tgacttggtt gagtactcac 4260  
cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca 4320  
taaccatgag tgataacact gcggccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg 4380  
agctaaccgc ttttttgcac aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaac 4440  
cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg 4500  
caacaacgtt gcgcaaaacta ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat 4560  
taatagactg gatggaggcg gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gcccttcggg 4620  
ctggctggtt tattgctgat aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg 4680  
cagcactggg gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc 4740  
aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc 4800  
attggtaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt 4860  
tttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt 4920  
aacgtgagtt ttcgttcac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt 4980  
gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaacca ccgctaccag 5040



cggtggtttg tttgccggat caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca 5100  
gcagagcgca gataccaaat actgttcttc tagttagcc gtagttaggc caccacttca 5160  
agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgctaata cctgttacca gtggctgctg 5220  
ccagtggcga taagtctgtg cttaccgggt tggactcaag acgatagtta ccggataagg 5280  
cgcagcggtc gggctgaacg gggggttcgt gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct 5340  
acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga 5400  
gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca gggtcggaac aggagagcgc acgaggggagc 5460  
ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg 5520  
agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg 5580  
cggccttttt acggttcctg gccttttgct ggccttttgc tcacatgttc tttcctgcgt 5640  
tateccctga ttctgtggat aaccgtatta ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc 5700  
gcagccgaac gaccgagcgc agcaggtcag tgagcgagga agcgggaagag cgccaatac 5760  
gcaaaccgcc tctccccgcg cgttggccga ttcattaatg cagctggcac gactagagtc 5820  
ccgtgaggc ggcgtagcag gtcagccgcc ccagcgggtg tcaccaaccg ggggtggaacg 5880  
gcgccggtat cgggtgtgtc cgtggcgctc attccaacct ccgtgtgttt gtgcaggttt 5940  
cgctgtttgc agtccctcgc accggcaccc gcagcgaggg gctcacgggt gccggtgggt 6000  
cgactagtgc agtgatggtg atggtgatgt cctcgagatc taagcttgga tccgcggccg 6060  
ctacgtagaa ttcccatatg cgctcccttc tctgacgccg tccacgtgc ctctcacgt 6120  
gacgtgaggt gcaagcccgg acgttccgcg tgccacgccg tgagccgccg cgtgccgtcg 6180  
gctccctcag cccgggcggc cgtgggagcc cgcctcgata tgtacaccgc agaagctccc 6240  
agcgtcctcc tgggcccga tactcgacca ccacgcacgc acaccgcaact aacgattcgg 6300  
ccggcgctcg attcggccgg cgctcgattc ggccggcgct cgattcggcc ggcgctcgat 6360  
tcggccggcg ctcgattcgg ccgagcagaa gagtgaacaa ccaccgacca cgcttccgct 6420  
ctgcgcgccg taccgacct acctcccga gctcgaagca gctcccggga gtaccgccgt 6480  
actcaccgc ctgtgtcac catccaccga cgcaaagccc aaccgagca cacctcttgc 6540  
accaaggtgc cgaccgtggc tttccgctcg cagggttcca gaagaaatcg aacgatccag 6600  
cgccgcaagg ttcaaaaagc aggggttggg ggggaggagg ttttggggg tgctgccggg 6660  
atacctgata tggtttgtt ttgcgtagtc gaataatctt ccatatagcc tcggcgcgctc 6720  
ggactcgaat agttgatgtg ggccgggcaca gttgccccat gaaatccgca acggggggcg 6780  
tgctgagcga tcggcaatgg gcggatgcgg tgttgcttcc gcaccggccg ttcgcgacga 6840

acaacctcca acgaggtcag taccggatga gccgcgacga cgcattggca atgcggtaçg 6900  
tcgagcattc accgcacgcg ttgctcggat ctatcgtcat cgactgcgat cacgttgacg 6960  
ccgcgatgcg cgcattcgag caaccatccg accatccggc gccgaactgg gtcgcacaat 7020  
cgccgtccgg ccgcgcacac atcggatggt ggctcggccc caaccacgtg tgccgcaccg 7080  
acagcgcccg actgacgcca ctgcgctacg cccaccgcat cgaaaccggc ctcaagatca 7140  
gcgtcggcgg cgatttcgcg tatggcgggc aactgaccaa aaacccgatt caccgccgatt 7200  
gggagacgat ctacggcccg gccaccccggt acacattgcg gcagctggcc accatccaca 7260  
caccgccgca gatgccgcgt cggcccgatc gggccgtggg cctggggccg aacgtcacca 7320  
tgttcgacgc caccggcgga tgggcatacc cgcagtgtg gcaacaccga aacggaaccg 7380  
gccgcgactg ggaccatctc gtcctgcagc actgccacgc cgtcaacacc gagttcacga 7440  
caccactgcc gttcacgaa gtacgcgcca ccgcgcaatc catctccaaa tggatctggc 7500  
gcaatttcac cgaagaacag taccgagccc gacaagcgca tctcggtcaa aaaggcggca 7560  
aggcaacgac actcgccaaa caagaagccg tccgaaacaa tgcaagaaag tacgacgaac 7620  
atacgatgcg agaggcgatt atctgatggg cggagccaaa aatccggtgc gccgaaagat 7680  
gacggcagca gcagcagccg aaaaattcgg tgcctccact cgcacaatcc aacgcttggt 7740  
tgctgagccg cgtgacgatt acctcgccg tgcgaaagct cgccgtgaca aagctgtcga 7800  
gctgcggaag caggggttga agtaccggga aatcgccgaa gcgatggaac tctcgaccgg 7860  
gatcgtcggc cgattactgc acgacgcccg caggcacggc gagatttcag cggaggatct 7920  
gtcggcgtaa ccaagtcagc gggttgtcgg gttccggccg gcgctcggca ctcggaaccg 7980  
ccggcggatg gtgttctgcc tctggcgag cgtcagctac cgccgaaggc ctgtcatcga 8040  
ccggcttcga ctgaagtatg agcaacgtca cagcctgtga ttggatgatc cgctcacgct 8100  
cgaccgctac ctgttcagct gccgcccgt gggcatgagc aacggccaac tctcgttcaa 8160

<210> 53

<211> 8189

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>-

<223> Description of Artificial Sequence:vector

## pTip-LNH1

&lt;400&gt; 53

gagctcgacc gcgcgggtcc cggacgggga agagcgggga gctttgccag agagcgacga 60  
cttcccccttg cgttggtgat tgccggtcag ggcagccatc cgccatcgtc gcgtaggggtg 120  
tcacacccca ggaatcgcgt cactgaacac agcagccggt aggacgacca tgactgagtt 180  
ggacaccatc gcaaatccgt ccgatcccgc ggtgcagcgg atcatcgatg tcaccaagcc 240  
gtcacgatcc aacataaaga caacgttgat cgaggacgtc gagccccctca tgcacagcat 300  
cgcggccggg gtggagtcca tcgaggtcta cggcagcgac agcagtcctt ttccatctga 360  
gttgctggat ctgtgcgggc ggcagaacat accggtccgc ctcatcgact cctcgatcgt 420  
caaccagttg ttcaaggggg agcggaaggc caagacattc ggcatcgccc gcgtccctcg 480  
cccgccagg ttccggcgata tcgcgagccg gcgtggggac gtcgtcgttc tcgacggggt 540  
gaagatcgtc gggaacatcg gcgcgatagt acgcacgtcg ctgcgcgtcg gagcgtcggg 600  
gatcatcctg gtggacagtg acatcaccag catcgcggac cggcgtctcc aaagggccag 660  
ccgaggttac gtctttctcc ttcccgctgt tctctccggt cgcgaggagg ccatcgctt 720  
cattcgggac agcggtatgc agctgatgac gctcaaggcg gatggcgaca tttccgtgaa 780  
ggaactcggg gacaatccgg atcggctggc cttgctgttc ggcagcgaaa aggggtgggc 840  
ttccgacctg ttcgaggagg cgtcttccgc ctcggtttcc atcccatga tgagccagac 900  
cgagtctctc aacgtttccg tttccctcgg aatcgcgctg cacgagagga tcgacaggaa 960  
tctcgcggcc aaccgataag cgcctctgtt cctcggacgc tcggttcctc gacctcgatt 1020  
cgtcagtgat gatcacctca cacggcagcg atcaccactg acatatcgag gtcaacggtc 1080  
gtggtccggg cgggcactcc tcgaaggcgc ggccgacgcc cttgaacgac tcgatgactc 1140  
tagagtaacg ggctactccg tttaacggac cccgtttctca cgcttttaggc ttgaccccg 1200  
agcctgcatg gggcattccg ccgtgaaccc ggtggaatgc ccccggcacc cgggctttcc 1260  
agcaaagatc acctggcgcc gatgagtaag gcgtacagaa ccaactccaca ggaggaccgt 1320  
cgagatgaaa tctaacaatg cgtcatcgt catcctcggc accgtcacc tggatgctgt 1380  
aggcataggc ttggttatgc cggctactgcc gggcctcttg cgggatatcg tccattccga 1440  
cagcatcgcc agtcactatg gcgtgctgct agcgtatat gcgttgatgc aatttctatg 1500  
cgcacccgtt ctgggagcac tgtccgaccg ctttggccgc cggccagtcc tgctcgcttc 1560  
gctacttgga gccactatcg actacgcgat catggcgacc acaccgtcc tgtggattct 1620  
ctacgccgga cgcatcgtgg ccggcatcac cggcgccaca ggtgcggtg ctggcgcta 1680

tatcgccgac atcaccgatg gggaagatcg ggctcgccac ttcgggctca tgagcgcttg 1740  
tttcggcgtg ggtatggtgg caggccccgt ggccggggga ctgttgggag ccatctcctt 1800  
gcatgcacca ttccttgagg cggcgggtgct caacggcctc aacctactac tgggctgctt 1860  
cctaatagcag gagtcgcata agggagagcg tcgtccgatg cccttgagag cttcaaccc 1920  
agtcagctcc ttcgggtggg cgcggggcat gactatcgtc gccgcactta tgactgtctt 1980  
ctttatcatg caactcgtag gacagggtgcc ggcagcgctc tgggtcattt tcggcgagga 2040  
ccgctttcgc tggagcgga cgatgatcgg cctgtcgctt gcggtattcg gaatcttgca 2100  
cgccctcgct caagccttcg tcaactggctc cgccacaaaa cgtttcggcg agaagcaggc 2160  
cattatcgcc ggcatggcgg ccgacgcgtt gggctacgtc ttgctggcgt tcgcgacgcg 2220  
aggtggtatg gccttcccc aattgattct tctcgcttcc ggccggcatc ggatgcccgc 2280  
gttgaggcgc atgctgtcca ggcaggtaga tgacgacct caggagacgc ttcaaggatc 2340  
gctcgaggct cttaccagcc taacttcgat cattggaccg ctgatcgta cggcgattta 2400  
tgccgcctcg gcgagcacat ggaacgggtt ggcatggatt gtaggcgcgc ccctatacct 2460  
tgtctgcctc ccgcggttgc gtcgcggtgc atggagccgc gccacctga cctgaatgga 2520  
agccggcggc acctcgctaa cggattcacc actccaagaa ttggagcaa tcaattcttg 2580  
cggagaactg tgaatgcgca aaccaaccct tggcagaaca tatccatcg gcctcgccatc 2640  
tccagcagcc gcacgcggcg catctcgggc agcgttgggt cctggccacg ggtgcgcatg 2700  
atcgtgctcc tgcgttgag gactagaatt gatctcctcg accgccaatt gggcatctga 2760  
gaatcatctg cgtttctcgc acgcaacgta cttgcaacgt tgcaactcct agtgttgta 2820  
atcacacccc accggggggg gggattgcag tcaccgattt ggtgggtgcg ccaggaaga 2880  
tcacgtttac ataggagctt gcaatgagct actccgtggg acagggtggc ggcttcgccc 2940  
gagtgcagggt gcgcacgctg caccactacg acgacatcgg cctgctcgta ccgagcgagc 3000  
gcagccacgc gggccaccgg cgctacagcg acgcccacct cgaccggctg cagcagatcc 3060  
tgttctaccg ggagctgggc ttcccgtcgc acgaggtcgc cgccctgctc gacgaccgg 3120  
ccgcggaccc gcgcgcgcac ctgcgcgcc agcacgagct gctgtccgc cggatcggga 3180  
aactgcagaa gatggcggcg gccgtggagc aggcgatgga ggcacgcagc atgggaatca 3240  
acctacccc ggaggagaag ttcgaggtct tcggcgactt cgaccccgac cagtacgagg 3300  
aggaggtccg ggaacgctgg gggaacaccg acgcctaccg ccagtccaag gagaagaccg 3360  
cctcgtacac caaggaggac tggcagcgca tccaggacga ggccgacgag ctacccggc 3420  
gcttcgtcgc cctgatggac gcgggtgagc ccgcccactc cgagggggcg atggacgccg 3480

ccgaggacca ccggcagggc atcgcccgca accactacga ctgcgggtac gagatgcaca 3540  
cctgcctggg cgagatgtac gtgtccgacg aacgtttcac gcgaaacatc gacgccgcca 3600  
agccgggcct cgccgcctac atgcgcgacg cgatcctcgc caacgccgtc cggcacaccc 3660  
cctgagcggg ggtcgtggcc cgggtctccc gcccggtctc accccacggc tcaactcccg 3720  
gccacgacca ccgccgtccc gtacgcgcac acctcggtgc ccacgtccgc cgcctccgtc 3780  
acgtcgaaac ggaagatccc cgggtaccga gctcgtcagg tggcactttt cggggaaatg 3840  
tgcgcggaac ccctatttgt ttatTTTTtct aaatacattc aaatatgtat ccgctcatga 3900  
gacaataacc ctgataaatg cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac 3960  
atttcctgtg cgcccttatt ccctTTTTtg cggcattttg ccttcctgtt tttgctcacc 4020  
cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt ggggtgcacga gtgggttaca 4080  
tcgaactgga totcaacagc ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc 4140  
caatgatgag cacttttaaa gttctgctat gtggcgcggg attatcccgt attgacgccg 4200  
ggcaagagca actcggtcgc cgcatacact attctcagaa tgacttggtt gagtactcac 4260  
cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca 4320  
taaccatgag tgataacact gcggccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg 4380  
agctaaccgc ttttttgac aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaaac 4440  
cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg 4500  
caacaacggt gcgcaaacta ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat 4560  
taatagactg gatggaggcg gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gcccttcagg 4620  
ctggctggtt tattgctgat aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg 4680  
cagcactggg gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc 4740  
aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc 4800  
attggtaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt 4860  
tttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt 4920  
aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt 4980  
gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaaacca ccgctaccag 5040  
cgggtggttg tttgccggat caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca 5100  
gcagagcgca gataccaaat actgttcttc tagtgtagcc gtagttaggc caccacttca 5160  
agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgctaata cctgttacca gtggctgctg 5220  
ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt tggactcaag acgatagtta ccggataagg 5280

cgcagcggtc gggctgaacg gggggttcgt gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct 5340  
acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga 5400  
gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca gggtcggaac aggagagcgc acgaggggagc 5460  
ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg 5520  
agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg 5580  
cggccttttt acggttcctg gccttttgct ggccttttgc tcacatgttc tttcctgcgt 5640  
tatcccctga ttctgtggat aaccgtatta ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc 5700  
gcagccgaac gaccgagcgc agcgagtcag tgagcgagga agcggaagag cgcccaatac 5760  
gcaaaccgcc tctccccgcg cgttggccga ttcattaatg cagctggcac gactagagtc 5820  
ccgctgaggc ggcgtagcag gtcagccgcc ccagcggtagg tcaccaaccg gggtagaacg 5880  
gcgcgggtat cgggtgtgtc cgtggcgctc attccaacct ccgtgtgttt gtgcagggtt 5940  
cgcgtgttgc agtccctcgc accggcaccc gcagcgaggg gctcacgggt gccggtaggt 6000  
cgactagtgc atcctcgaga tctaagcttg gatccgcggc cgctacgtag aattcccata 6060  
tggtgatggg gatggtaggc catggtatat ctcttctta aagttaaaca aaattatttc 6120  
tagacgccgt ccacgtgcc tctcacgtg acgtgaggtag caagcccga cgttcgcgt 6180  
gccacgccgt gagccgccgc gtgccgtcgg ctccctcagc ccgggcggcc gtgggagccc 6240  
gcctcgatat gtacaccga gaagctcca gcgtcctcct gggccgcgat actcgaccac 6300  
cacgcacgca caccgacta acgattcggc cggcgctcga ttcggccggc gctcgattcg 6360  
gccggcgctc gattcggccg gcgctcgatt cggccggcgc tcgattcggc cgagcagaag 6420  
agtgaacaac caccgaccac gcttcgcgc tgcgcgccgt acccgacct cctccgcag 6480  
ctcgaagcag ctcccgaggag taccgcgta ctcacccgcc tgtgctcacc atccaccgac 6540  
gcaaagccca acccgagcac acctcttgca ccaaggtgcc gaccgtggct ttccgctcgc 6600  
agggttccag aagaaatcga acgatccagc gcggcaaggt tcaaaaagca ggggttggtg 6660  
gggaggaggt tttggggggg gtcgccggga tacctgatat ggctttgttt tgcgtagtcg 6720  
aataattttc catatagcct cggcgcgctc gactcgaata gttgatgtgg gcgggcacag 6780  
ttgccccatg aaatccgcaa cggggggcgt gctgagcgat cggcaatggg cggatgcggt 6840  
gttgcttccg caccggcgt tcgcgacgaa caacctccaa cgaggtcagt accggatgag 6900  
ccgcgacgac gcattggcaa tgcggtacgt cgagcattca ccgcacgcgt tgctcggatc 6960  
tatcgtcadc gactgcgac acgttgacgc cgcgatgcgc gcattcgagc aacctccga 7020  
ccatccggcg ccgaactggg tcgcacaatc gccgtccggc cgcgcacaca tcggatgggtg 7080

gctcggcccc aaccacgtgt gccgcaccga cagcgcccga ctgacgccac tgcgctacgc 7140  
 ccaccgcatac gaaaccggcc tcaagatcag cgtcggcggc gatttcgcgt atggcgggca 7200  
 actgacaaaa aaccgattc acccggattg ggagacgatac tacggcccgg ccaccccgta 7260  
 cacattgcgg cagctggcca ccatccacac acccggcgag atgccgcgtc ggcccgatcg 7320  
 ggccgtgggc ctggggccga acgtcaccat gttcgacgcc acccggcgat gggcataccc 7380  
 gcagtgggtg caacaccgaa acggaaccgg ccgcgactgg gaccatctcg tcctgcagca 7440  
 ctgccacgcc gtcaacaccg agttcacgac accactgccg ttcaccgaag tacgcgccac 7500  
 cgcgcaatcc atctccaaat ggatctggcg caatttcacc gaagaacagt accgagcccg 7560  
 acaagcgcat ctcggtaaaa aaggcggcaa ggcaacgaca ctgcctaaac aagaagccgt 7620  
 ccgaaacaat gcaagaaagt acgacgaaca tacgatgcga gaggcgatta tctgatgggc 7680  
 ggagccaaaa atccggtgcg ccgaaagatg acggcagcag cagcagccga aaaattcggg 7740  
 gcctccactc gcacaatcca acgcttggtt gctgagccgc gtgacgatta cctcggccgt 7800  
 gcgaaagctc gccgtgacaa agctgtcgag ctgcggaagc aggggttgaa gtaccgggaa 7860  
 atcgccgaag cgatggaact ctgcaccggg atcgtcggcc gattactgca cgacgcccgc 7920  
 aggcacggcg agatttcagc ggaggatctg tcggcgtaac caagtcagcg gggtgtcggg 7980  
 ttccggcccg cgctcggcac tcggaccggc cggcggatgg tgttctgcct ctggcgacgc 8040  
 gtcagctacc gccgaaggcc tgtcatcgac cggcttcgac tgaagtatga gcaacgtcac 8100  
 agcctgtgat tggatgatcc gctcacgctc gaccgctacc tgttcagctg ccgcccgtg 8160  
 ggcatgagca acggccaact ctcgttcaa 8189

<210> 54

<211> 8183

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:vector

pTip-LNH2

<400> 54

gagctcgacc gcgcgggtcc cggacgggga agagcgggga gctttgccag agagcgacga 60

cttccccttg cgttggtgat tgccgggtcag ggcagccatc cgccatcgtc gcgtaggggtg 120  
tcacacccca ggaatcgcgt cactgaacac agcagccggt aggacgacca tgactgagtt 180  
ggacaccatc gcaaatccgt ccgatcccgc ggtgcagcgg atcatcgatg tcaccaagcc 240  
gtcacgatcc aacataaaga caacgttgat cgaggacgtc gagccccctca tgcacagcat 300  
cgcggccggg gtggagttca tcgaggtcta cggcagcgcac agcagtcctt ttccatctga 360  
gttgctggat ctgtgcgggc ggcagaacat accggtccgc ctcatcgact cctcgatcgt 420  
caaccagttg ttcaaggggg agcgggaaggc caagacattc ggcatcgccc gcgtccctcg 480  
cccggccagg ttccggcgata tcgcgagccg gcgtggggac gtcgtcgttc tcgacgggggt 540  
gaagatcgtc gggaacatcg gcgcgatagt acgcacgtcg ctgcgcgtcg gagcgtcggg 600  
gatcatcctg gtggacagtg acatcaccag catcgcgac cggcgtctcc aaagggccag 660  
ccgaggttac gtcttctccc ttcccgtcgt tctctccggt cgcgaggagg ccatcgcctt 720  
cattcgggac agcggtatgc agctgatgac gctcaaggcg gatggcgaca tttccgtgaa 780  
ggaactcggg gacaatccgg atcggctggc cttgctgttc ggcagcgaaa aggggtgggcc 840  
ttccgacctg ttcgaggagg cgtcttccgc ctcggtttcc atcccatga tgagccagac 900  
cgagtctctc aacgtttccg tttccctcgg aatcgcgctg cacgagagga tcgacaggaa 960  
tctcgggcc aaccgataag cgcctctgtt cctcggacgc tcggttcctc gacctcgatt 1020  
cgtcagtgat gatcacctca cacggcagcg atcaccactg acatatcgag gtcaacggtc 1080  
gtggtccggg cgggcactcc tcgaaggcgc ggccgacgcc cttgaacgac tcgatgactc 1140  
tagagtaacg ggctactccg tttaacggac ccggttctca cgcttttaggc ttgaccccg 1200  
agcctgcattg gggcattccg ccgtgaaccc ggtggaatgc ccccggcacc cgggctttcc 1260  
agcaaagatc acctggcgcc gatgagtaag gcgtacagaa ccactccaca ggaggaccgt 1320  
cgagatgaaa tctaacaatg cgctcatcgt catcctcggc accgtcacc tggatgctgt 1380  
aggcataggc ttggttatgc cggctactgcc gggcctcttg cgggatatcg tccattccga 1440  
cagcatcgcc agtcactatg gcgtgctgct agcgctatat gcgttgatgc aatttctatg 1500  
cgcacccgtt ctcgagcac tgtccgaccg ctttggccgc cgcccagtc tgctcgcttc 1560  
gctacttgga gccactatcg actacgcgat catggcgacc acaccgctc tgtggattct 1620  
ctacgccgga cgcatcgtgg ccggcatcac cggcgccaca ggtgcggttg ctggcgcta 1680  
tatcgccgac atcaccgatg gggaagatcg ggctcgccac ttcgggctca tgagcgcttg 1740  
tttcggcgtg ggtatggtgg caggccccgt ggccggggga ctgttgggcg ccatctcctt 1800  
gcatgcacca ttccttgccg cggcggtgct caacggcctc aacctactac tgggctgctt 1860



cctaatagcag gagtcgcata agggagagcgc tcgtccgatg cccttgagag ccttcaaccc 1920  
agtcagctcc ttccggtggg cgcggggcat gactatcgtc gccgcactta tgactgtctt 1980  
ctttatcatg caactcgtag gacaggtgcc ggcagcgctc tgggtcattt tcggcgagga 2040  
ccgctttcgc tggagcgcga cgatgatcgg cctgtcgctt gcggtattcg gaatcttgca 2100  
cgccctcgct caagccttcg tcaactggctc cgccacaaaa cgtttcggcg agaagcaggc 2160  
cattatcgcc ggcatggcgg ccgacgcgtc gggctacgtc ttgctggcgt tcgcgacgcg 2220  
aggctggatg gccttcccca ttatgattct tctcgcttcc ggcggcatcg ggatgcccgc 2280  
gttgcaggcc atgctgtcca ggcaggtaga tgacgaccat cagggacagc ttcaaggatc 2340  
gctcgcggct cttaccagcc taacttcgat cattggaccg ctgatcgta cggcgattta 2400  
tgccgcctcg gcgagcacat ggaacgggtt ggcatggatt gtaggcgccg ccctatacct 2460  
tgtctgcctc cccgcgttgc gtcgcgggtc atggagccgg gccacctga cctgaatgga 2520  
agccggcggc acctcgctaa cggattcacc actccaagaa ttggagcaa tcaattcttg 2580  
cggagaactg tgaatgcgca aaccaacct tggcagaaca tatccatcgc gtccgccatc 2640  
tccagcagcc gcacgcggcg catctcgggc agcgttgggt cctggccacg ggtgcgcgtg 2700  
atcgtgctcc tgctgttgag gactagaatt gatctcctcg accgccaatt gggcatctga 2760  
gaatcatctg cgtttctcgc acgcaacgta cttgcaacgt tgcaactcct agtgttgtga 2820  
atcacacccc accgggggggt gggattgcag tcaccgattt ggtgggtgcg cccaggaaga 2880  
tcacgtttac ataggagctt gcaatgagct actccgtggg acaggtggcc ggcttcgccg 2940  
gagtgacggt gcgcacgctg caccactacg acgacatcgg cctgctcgta ccgagcgagc 3000  
gcagccacgc gggccaccgg cgctacagcg acgccgacct cgaccggctg cagcagatcc 3060  
tgttctaccg ggagctgggc ttcccgtcgc acgaggtcgc cgccctgctc gacgaccgg 3120  
ccgcggaccc gcgcgcgcac ctgcgccgcc agcacgagct gctgtccgcc cggatcggga 3180  
aactgcagaa gatggcggcg gccgtggagc aggcgatgga ggcacgcagc atgggaatca 3240  
acctacccc ggaggagaag ttcgaggtct tcggcgactt cgaccccgac cagtacgagg 3300  
aggaggtccg ggaacgctgg gggaacaccg acgcctaccg ccagtccaag gagaagaccg 3360  
cctcgtacac caaggaggac tggcagcgca tccaggacga ggccgacgag ctcacccggc 3420  
gcttcgtcgc cctgatggac gcgggtgagc ccgccgactc cgagggggcg atggacgccg 3480  
ccgaggacca ccggcagggc atgccccga accactacga ctgcgggtac gagatgcaca 3540  
cctgcctggg cgagatgtac gtgtccgacg aacgtttcac gcgaaacatc gacgccgcca 3600  
agccgggcct cgccgcctac atgcgcgacg cgatcctcgc caacgccgtc cggcacaccc 3660

cctgagcggg ggtcgtggcc cgggtctccc gcccggtctc accccacggc tcaactcccgg 3720  
gccacgacca ccgccgtccc gtacgcgcac acctcggtgc ccacgtccgc cgcctccgtc 3780  
acgtcgaaac ggaagatccc cgggtaccga gtcgtcagg tggcactttt cggggaaatg 3840  
tgcgcggaac ccctatttgt ttatttttct aaatacattc aaatatgtat ccgctcatga 3900  
gacaataacc ctgataaatg cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac 3960  
atttccgtgt cgcccttatt cccttttttg cggcattttg ctttctgtt tttgctcacc 4020  
cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt ggggtgcacga gtgggttaca 4080  
tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc 4140  
caatgatgag cactttttaa gttctgctat gtggcgcggt attatcccggt attgacgccg 4200  
ggcaagagca actcggtcgc cgcatacact attctcagaa tgacttggtt gagtactcac 4260  
cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgcc 4320  
taaccatgag tgataacact gcggccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg 4380  
agctaaccgc ttttttgac aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaa 4440  
cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg 4500  
caacaacggt gcgcaaacta ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat 4560  
taatagactg gatggaggcg gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg 4620  
ctggctggtt tattgctgat aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg 4680  
cagcactggg gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc 4740  
aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc 4800  
attggtaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt 4860  
tttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc ttttgataa tctcatgacc aaaatccctt 4920  
aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt 4980  
gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaacca ccgctaccag 5040  
cgggtggttg tttgccgat caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca 5100  
gcagagcgca gataccaaat actgttcttc tagtgtagcc gtagttaggc caccacttca 5160  
agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgctaatt cctgttacca gtggctgctg 5220  
ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt tggactcaag acgatagtta ccggataagg 5280  
cgcagcggtc gggctgaacg ggggggttcgt gcacacagcc cagcttgag cgaacgacct 5340  
acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga 5400  
gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc 5460

ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg 5520  
agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggccgagcct atggaaaaac gccagcaacg 5580  
cgcccttttt acggttcctg gcctttttgct ggccttttgc tcacatgttc tttcctgcgt 5640  
tatcccctga ttctgtggat aaccgtatta ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc 5700  
gcagccgaac gaccgagcgc agcgagtcag tgagcgagga agcggaagag cgcccaatac 5760  
gcaaaccgcc tctccccgcg cgttggccga ttcattaatg cagctggcac gactagagtc 5820  
ccgctgaggc ggcgtagcag gtcagccgcc ccagcgggtg tcaccaaccg ggggtggaacg 5880  
gcgccggtat cgggtgtgtc cgtggcgctc attccaacct ccgtgtgttt gtgcagggtt 5940  
cgcggtgttc agtcctcgc accggcacc gcagcgaggg gctcacgggt gccggtgggt 6000  
cgactagttc agtgatggtg atggtgatgt cctcgagatc taagcttgga tccgcggccg 6060  
ctacgtagaa ttcccatggt atatctcctt cttaaagtta aacaaaatta tttctagacg 6120  
ccgtccacgc tgcctcctca cgtgacgtga ggtgcaagcc cggacgttcc gcgtgccacg 6180  
ccgtgagccg ccgcgtgccg tcggctccct cagcccgggc ggccgtggga gcccgccctg 6240  
atatgtacac ccgagaagct ccagcgtcc tcctgggccg cgatactcga ccaccacgca 6300  
cgcacaccgc actaacgatt cggccggcgc tcgattcggc cggcgctcga ttcggccggc 6360  
gctcgattcg gccggcgctc gattcggccg gcgctcgatt cggccgagca gaagagtga 6420  
caaccaccga ccacgttcc gctctgcgcg ccgtaccga cctacctcc gcagctcgaa 6480  
gcagctcccg ggagtaccgc cgtactcaac cgcctgtgct caccatccac cgacgcaaag 6540  
cccaaccga gcacacctct tgcaccaagg tgccgaccgt ggctttccgc tcgcagggtt 6600  
ccagaagaaa tcgaacgatc cagcgcggca aggttcaaaa agcaggggtt ggtggggagg 6660  
aggttttggg ggggtgtgcc gggatacctg atatggcttt gttttgcgta gtcgaataat 6720  
tttccatata gcctcggcgc gtcggactcg aatagttgat gtgggcgggc acagttgcc 6780  
catgaaatcc gcaacggggg gcgtgctgag cgatcggcaa tgggcggatg cgggtgtgct 6840  
tccgcaccgg ccgttcgcga cgaacaacct ccaacgaggt cagtaccgga tgagccgcga 6900  
cgacgcattg gcaatgcggt acgtcgagca ttcaccgcac gcgttgctcg gatctatcgt 6960  
catcgactgc gatcacgttg acgcccgat gcgcgcattc gagcaaccat ccgaccatcc 7020  
ggcgccgaac tgggtcgcac aatcgccgtc cggccgcgca cacatcggat ggtggctcgg 7080  
ccccaaccac gtgtgccga ccgacagcgc ccgactgacg ccactgcgct acgcccaccg 7140  
catcgaaacc ggcctcaaga tcagcgtcgg cggcgatttc gcgtatggcg ggcaactgac 7200  
caaaaaccg attcaccgcg attgggagac gatctacggc ccggccacc cgtacacatt 7260

gcggcagctg gccaccatcc acacaccccg gcagatgccg cgtcggcccg atcgggcccgt 7320  
 gggcctgggc cgcaacgtca ccatgttcga cgccacccgg cgatgggcat acccgcagtg 7380  
 gtggcaacac cgaaacggaa ccggccgcga ctgggaccat ctctctctgc agcactgcca 7440  
 cgccgtcaac accgagttca cgacaccact gccgttcacc gaagtacgcg ccaccgcgca 7500  
 atccatctcc aaatggatct ggcgcaattt caccgaagaa cagtaccgag cccgacaagc 7560  
 gcatctcggg caaaaaggcg gcaaggcaac gacactcgcc aaacaagaag ccgtccgaaa 7620  
 caatgcaaga agtacgacg aacatacgat gcgagaggcg attatctgat gggcggagcc 7680  
 aaaaatccgg tgcgccgaaa gatgacggca gcagcagcag ccgaaaaatt cgggtgcctcc 7740  
 actcgacaaa tccaacgctt gtttgctgag ccgcgtgacg attacctcg ccgtgcgaaa 7800  
 gctcgccgtg acaaagctgt cgagctgcgg aagcaggggt tgaagtaccg ggaaatcgcc 7860  
 gaagcgatgg aactctcgac cgggatcgtc ggccgattac tgcacgacgc ccgcaggcac 7920  
 ggcgagattt cagcggagga tctgtcggcg taaccaagtc agcgggttgt cgggttccgg 7980  
 ccggcgctcg gcactcggac cggccggcgg atgggtgttct gcctctggcg cagcgtcagc 8040  
 taccgccgaa ggctgtcat cgaccggctt cgactgaagt atgagcaacg tcacagcctg 8100  
 tgattggatg atccgctcac gctcgaccgc tacctgttca gctgccgccc gctgggcatg 8160  
 agcaacggcc aactctcggtt caa 8183

<210> 55

<211> 8123

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:vector

pTip-LCH1

<400> 55

gagctcgacc gcgcgggtcc cggacgggga agagcgggga gctttgccag agagcgacga 60  
 cttccccttg cgttggtgat tgccggtcag ggcagccatc cgccatcgtc gcgtagggtg 120  
 tcacacccca ggaatcgcgt cactgaacac agcagccggt aggacgacca tgactgagtt 180

ggacaccatc gcaaatccgt ccgatcccgc ggtgcagcgg atcatcgatg tcaccaagcc 240  
gtcacgatcc aacataaaga caacgttgat cgaggacgtc gagccccctca tgcacagcat 300  
cgcgggccggg gtggagttca tcgaggtcta cggcagcgac agcagtcctt ttccatctga 360  
gttgctggat ctgtgcgggc ggcagaacat accggtccgc ctcatcgact cctcgatcgt 420  
cccggccagg ttcggcgata tcgcgagccg gcgtggggac gtcgtcgttc tcgacgggggt 480  
gaagatcgtc gggaacatcg gcgcgatagt acgcacgtcg ctgcgcgtcg gagcgtcggg 540  
gatcatcctg gtggacagtg acatcaccag catcgcgac cggcgtctcc aaagggccag 600  
ccgaggttac gtcttctccc ttcccgtcgt tctctccggt cgcgaggagg ccatcgcctt 660  
cattcgggac agcggtatgc agctgatgac gctcaaggcg gatggcgaca tttccgtgaa 720  
ggaactcggg gacaatccgg atcggctggc cttgctgttc ggcagcgaaa aggggtgggcc 780  
ttccgacctg ttcgaggagg cgtcttccgc ctcggtttcc atcccatga tgagccagac 840  
cgagtctctc aacgtttccg tttccctcgg aatcgcgctg cacgagagga tcgacaggaa 900  
tctcgcggcc aaccgataag cgcctctgtt cctcggacgc tcggttcctc gacctcgatt 960  
cgtcagtgat gatcacctca cacggcagcg atcaccactg acatatcgag gtcaacggtc 1020  
gtggtccggg cgggcactcc tcgaaggcgc ggccgacgcc cttgaacgac tcgatgactc 1080  
tagagtaacg ggctactccg tttaacggac cccgttctca cgctttaggc ttgaccccg 1140  
agcctgcatg gggcattccg ccgtgaacct ggtggaatgc ccccggcacc cgggctttcc 1200  
agcaaagatc acctggcgcc gatgagtaag gcgtacagaa ccaactccaca ggaggaccgt 1260  
cgagatgaaa tctaacaatg cgctcatcgt catcctcggc accgtcacc tggatgctgt 1320  
aggcataggc ttggttatgc cggctactgcc gggcctcttg cgggatatcg tccattccga 1380  
cagcatcgcc agtcactatg gcgtgctgct agcgtatat gcgttgatgc aatttctatg 1440  
cgcacccgtt ctcgagcac tgtccgaccg ctttggcgcg cggccagtcc tgctcgcttc 1500  
gctacttgga gccactatcg actacgcgat catggcgacc acaccgtcc tgtggattct 1560  
ctacgccgga cgcatcgtgg ccggcatcac cggcgccaca ggtgcggttg ctggcgcccta 1620  
tatcgccgac atcaccgatg gggaagatcg ggctcgccac ttcgggctca tgagcgcttg 1680  
tttcggcgtg ggtatggtag caggccccgt ggccggggga ctgttgggag ccatctcctt 1740  
gcatgcacca ttccttgagg cggcggtgct caacggcctc aacctactac tgggctgctt 1800  
cctaatacag gactcgcata agggagagcg tcgtccgatg cccttgagag ccttcaacct 1860  
agtcagctcc ttccggtggg cgcggggcat gactatcgtc gccgcactta tgactgtctt 1920  
ctttatcatg caactcgtag gacaggtgcc ggcagcgctc tgggtcattt tcggcgagga 1980

ccgctttcgc tggagcgcga cgatgatcgg cctgtcgcctt gcggtattcg gaatcttgca 2040  
cgccctcgct caagccttcg tcactgggtcc cgccaccaaa cgtttcggcg agaagcaggc 2100  
cattatcgcc ggcatggcgg ccgacgcgct gggctacgtc ttgctggcgt tcgcgacgcg 2160  
aggctggatg gccttcccca ttatgattct tctcgccttc ggcggcacatc ggatgcccgc 2220  
gttgaggcc atgctgtcca ggcaggtaga tgacgaccat caggacagc ttcaaggatc 2280  
gctcgcggct cttaccagcc taacttcgat cattggaccg ctgatcgtca cggcgattta 2340  
tgccgcctcg gcgagcacat ggaacgggtt ggcatggatt gtaggcgccg ccctatacct 2400  
tgtctgcctc cccgcgttgc gtcgcggtgc atggagccgg gccacctcga cctgaatgga 2460  
agccggcggc acctcgctaa cggattcacc actccaagaa ttggagccaa tcaattcttg 2520  
cggagaactg tgaatgcgca aaccaaccct tggcagaaca tatccatcgc gtccgccatc 2580  
tccagcagcc gcacgcggcg catctcgggc agcgttgggt cctggccacg ggtgcgcacg 2640  
atcgtgctcc tgtcgttgag gactagaatt gatctcctcg accgccaatt gggcatctga 2700  
gaatcatctg cgtttctcgc acgcaacgta cttgcaacgt tgcaactcct agtgttgatga 2760  
atcacacccc accgggggggt gggattgcag tcaccgattt ggtgggtgcg cccaggaaga 2820  
tcacgtttac ataggagctt gcaatgagct actccgtggg acagggtggc ggcttcgccg 2880  
gagtgcgggt gcgcacgctg caccactacg acgacatcgg cctgctcgta ccgagcgagc 2940  
gcagccacgc gggccaccgg cgctacagcg acgccgacct cgaccggctg cagcagatcc 3000  
tgttctaccg ggagctgggc ttcccgctcg acgaggtcgc cgccctgctc gacgaccgg 3060  
ccgcggaccc gcgcgcgcac ctgcgcgcgc agcacgagct gctgtccgcc cggatcggga 3120  
aactgcagaa gatggcggcg gccgtggagc aggcgatgga ggcacgcagc atgggaatca 3180  
acctacccc ggaggagaag ttcgaggtct tcggcgactt cgaccccgac cagtacgagg 3240  
aggaggtccg ggaacgctgg gggaacaccg acgcctaccg ccagtccaag gagaagaccg 3300  
cctcgtacac caaggaggac tggcagcgca tccaggacga ggccgacgag ctcaccggc 3360  
gcttcgtcgc cctgatggac gcgggtgagc ccgccgactc cgagggggcg atggacgccg 3420  
ccgaggacca ccggcagggc atgcgccgca accactacga ctgcgggtac gagatgcaca 3480  
cctgcctggg cgagatgtac gtgtccgacg aacgtttcac gcgaaacatc gacgccgcca 3540  
agccgggcct cgccgcctac atgcgcgacg cgatcctcgc caacgccgtc cggcacaccc 3600  
cctgagcggg ggtcgtggcc cgggtctccc gcccggtctc accccacggc tcaactcccg 3660  
gccacgacca ccgccgtccc gtacgcgcac acctcgggtg ccacgtccgc cgcctccgtc 3720  
acgtcgaaac ggaagatccc cgggtaccga gctcgtcagg tggcactttt cggggaaatg 3780

tgcgcggaac ccctatttgt ttatTTTTct aaatacatto aaatatgtat ccgctcatga 3840  
gacaataacc ctgataaatg cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac 3900  
atttcctgtg cgccttatt ccctTTTTtg cggcattttg ccttcctgtt tttgctcacc 3960  
cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt ggggtgcacga gtgggttaca 4020  
tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc 4080  
caatgatgag cactttttaa gttctgctat gtggcgcggt attatcccgt attgacgccg 4140  
ggcaagagca actcggtcgc cgcatacact attctcagaa tgacttggtt gagtactcac 4200  
cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca 4260  
taaccatgag tgataacact gcggccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg 4320  
agctaaccgc ttttttgcaac aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaaac 4380  
cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg 4440  
caacaacgtt gcgcaaacta ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat 4500  
taatagactg gatggaggcg gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg 4560  
ctggctggtt tattgctgat aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg 4620  
cagcactggg gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc 4680  
aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc 4740  
attggtaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt 4800  
tttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt 4860  
aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt 4920  
gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaacca ccgctaccag 4980  
cgggtggttg tttgccgat caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca 5040  
gcagagcgca gataccaaat actgttcttc tagtgtagcc gtagttaggc caccacttca 5100  
agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgctaata cctgttacca gtggctgctg 5160  
ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt tggactcaag acgatagtta ccggataagg 5220  
cgcagcggtc gggctgaacg ggggggttctg gcacacagcc cagcttgag cgaacgacct 5280  
acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga 5340  
gaaaggcgga caggatatccg gtaagcggca gggctcggaac aggagagcgc acgagggagc 5400  
ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg 5460  
agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg 5520  
cggccttttt acggttcctg gccttttgct ggccttttgc tcacatgttc tttcctgcgt 5580

tatcccctga ttctgtggat aaccgtatta ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc 5640  
gcagccgaac gaccgagcgc agcgagtcag tgagcgagga agcggaagag cgcccaatac 5700  
gcaaaccgcc tctccccgcg cgttggccga ttcattaatg cagctggcac gactagagtc 5760  
ccgtgaggc ggcgtagcag gtcagccgcc ccagcgggtg tcaccaaccg ggggtggaacg 5820  
gcgccggtat cgggtgtgtc cgtggcgctc attccaacct ccgtgtgttt gtgcaggttt 5880  
cgcgtgttgc agtccctcgc accggcaccg gcagcgaggg gctcacgggt gccggtgggt 5940  
cgactagtgc agtgatggtg atggtgatgt cctcgagatc taagcttgga tccgcggccg 6000  
ctacgtagaa ttcccatggt atatctcctt cttaaagtta aacaaaatta tttctagacg 6060  
ccgtccacgc tgctcctca cgtgacgtga ggtgcaagcc cggacgttcc gcgtgccacg 6120  
ccgtgagccg ccgctgcccgc tcggctccct cagcccgggc ggccgtggga gcccgccctcg 6180  
atatgtacac ccgagaagct ccagcgtcc tcctgggccc cgatactcga ccaccacgca 6240  
cgcacaccgc actaacgatt cggccggcgc tcgattcggc cggcgctcga ttccggccggc 6300  
gctcgattcg gccggcgctc gattcggccg gcgctcgatt cggccgagca gaagagtga 6360  
caaccaccga ccacgcttcc gctctgcgcg ccgtaccga cctacctccc gcagctcgaa 6420  
gcagctcccg ggagtaccgc cgtactcacc cgcctgtgct caccatccac cgacgcaaag 6480  
cccaaccga gcacacctct tgcaccaagg tgccgaccgt ggctttccgc tcgcagggtt 6540  
ccagaagaaa tcgaacgatc cagcgcggca aggttcaaaa agcaggggtt ggtggggagg 6600  
aggttttggg ggggtgtcgcc gggatacctg atatggcttt gttttgcgta gtcgaataat 6660  
tttccatata gcctcggcgc gtcggactcg aatagttgat gtggcggggc acagttgccc 6720  
catgaaatcc gcaacggggg gcgtgctgag cgatcggcaa tgggcggatg cgggtgtgct 6780  
tccgcaccgg ccgttcgcga cgaacaacct ccaacgaggt cagtaccgga tgagccgcga 6840  
cgacgcattg gcaatgcggt acgtcgagca ttcaccgcac gcgttgctcg gatctatcgt 6900  
catcgactgc gatcacgttg acgcccgat gcgcgcattc gagcaaccat ccgaccatcc 6960  
ggcgccgaac tgggtcgcac aatcgccgct cggccgcgca cacatcgat ggtggctcgg 7020  
ccccaaccac gtgtgccga ccgacagcgc ccgactgacg ccaactgcgt acgcccaccg 7080  
catcgaaacc ggctcaaga tcagcgtcgg cggcgatttc gcgtatggcg ggcaactgac 7140  
caaaaaccg attcaccg attgggagac gatctacggc ccggccaccg cgtacacatt 7200  
gcggcagctg gccaccatcc acacaccg gcagatgccg cgtcggcccg atcgggcccgt 7260  
gggcctgggc cgcaacgtca ccatgttcga cgccaccg cgatgggcat acccgagtg 7320  
gtggcaacac cgaaacggaa ccggccgcga ctgggacat ctcgtcctgc agcactgcca 7380



cgccgtcaac accgagttca cgacaccact gccgttcacc gaagtacgcg ccaccgcgca 7440  
atccatctcc aaatggatct ggcgcaatth caccgaagaa cagtaccgag cccgacaagc 7500  
gcatctcggt caaaaaggcg gcaaggcaac gacactcgcc aaacaagaag ccgtccgaaa 7560  
caatgcaaga aagtacgacg aacatacgat gcgagaggcg attatctgat gggcggagcc 7620  
aaaaatccgg tgcgccgaaa gatgacggca gcagcagcag ccgaaaaatt cgggtgcctcc 7680  
actcgcacaa tccaacgctt gtttgctgag ccgcgtgacg attacctcgg ccgtgcgaaa 7740  
gctcgccgtg acaaagctgt cgagctgcgg aagcaggggt tgaagtaccg ggaaatcgcc 7800  
gaagcgatgg aactctcgac cgggatcgtc ggccgattac tgcacgacgc ccgcaggcac 7860  
ggcgagatth cagcggagga tctgtcggcg taaccaagtc agcgggttgt cgggttccgg 7920  
ccggcgctcg gcactcggac cggccggcgg atggtgttct gcctctggcg cagcgtcagc 7980  
taccgccgaa ggcctgtcat cgaccggctt cgactgaagt atgagcaacg tcacagcctg 8040  
tgattggatg atccgctcac gctcgaccgc tacctgttca gctgccgcc cgtgggcatg 8100  
agcaacggcc aactctcgth caa 8123

<210> 56

<211> 8184

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:vector

pTip-LCH2

<400> 56

gagctcgacc gcgcgggtcc cggacgggga agagcgggga gctttgccag agagcgacga 60  
cttccccttg cgttggtgat tgccggtcag ggcagccatc cgccatcgtc gcgtagggtg 120  
tcacacccca ggaatcgct cactgaacac agcagccggt aggacgacca tgactgagth 180  
ggacaccatc gcaaattcgt ccgatcccgc ggtgcagcgg atcatcgatg tcaccaagcc 240  
gtcacgatcc aacataaaga caacgttgat cgaggacgtc gagcccctca tgcacagcat 300  
cgcggtcggg gtggagthca tcgaggtcta cggcagcgac agcagtcctt ttccatctga 360  
gttgctggat ctgtgcgggc ggcagaacat accggtccgc ctcatcgact cctcgatcgt 420

caaccagttg ttcaaggggg agcggaaggc caagacattc ggcatcgccc gcgtccctcg 480  
cccggccagg ttcggcgata tcgcgagccg gcgtggggac gtcgtcgttc tcgacgggggt 540  
gaagatcgtc gggaacatcg gcgcgatagt acgcacgtcg ctgcgcgtcg gagcgtcggg 600  
gatcatcctg gtggacagtg acatcaccag catcgcgga cggcgctctc aaagggccag 660  
ccgaggttac gtcttctccc ttcccgtcgt tctctccggg cgcgaggagg ccatcgccctt 720  
cattcgggac agcggatatg agctgatgac gctcaaggcg gatggcgaca tttccgtgaa 780  
ggaactcggg gacaatccgg atcggctggc cttgctgttc ggcagcgaaa aggggtgggcc 840  
ttccgacctg ttcgaggagg cgtcttccgc ctcggtttcc atcccatga tgagccagac 900  
cgagtctctc aacgtttccg tttccctcgg aatcgcgctg cagcagagga tcgacaggaa 960  
tctcgcggcc aaccgataag cgcctctgtt cctcggaacg tcggttcctc gacctcgatt 1020  
cgtcagtgat gatcacctca cacggcagcg atcaccactg acatatcgag gtcaacggtc 1080  
gtggtccggg cgggcactcc tcgaaggcgc ggccgacgcc cttgaacgac tcgatgactc 1140  
tagagtaacg ggctactccg tttaacggac cccgttctca cgctttaggc ttgaccccgg 1200  
agcctgcatg gggcattccg ccgtgaacct ggtggaatgc ccccggcacc cgggctttcc 1260  
agcaaagatc acctggcgcc gatgagtaag gcgtacagaa ccaactccaca ggaggaccgt 1320  
cgagatgaaa tctaacaatg cgctcatcgt catcctcggc accgtcaccc tggatgctgt 1380  
aggcataggc ttggttatgc cggctactgc gggcctcttg cgggatatcg tccattccga 1440  
cagcatcgcc agtcactatg gcgtgctgct agcgctatat gcgttgatgc aatttctatg 1500  
cgcacccgtt ctcgagacac tgtccgaccg ctttggccgc cgcccagtc tgctcgcttc 1560  
gctacttga gccactatcg actacgcgat catggcgacc acaccgctc tgtggattct 1620  
ctacgccga cgcacgtgg ccggcatcac cggcgccaca ggtgcggttg ctggcgcta 1680  
tatcgccgac atcaccgatg gggaagatcg ggctcgccac ttcgggctca tgagcgcttg 1740  
tttcggcgtg ggtatggtgg caggccccgt ggccggggga ctgttgggcg ccatctcctt 1800  
gcatgcacca ttccttgccg cggcggtgct caacggcctc aacctactac tgggctgctt 1860  
cctaattgcag gagtcgcata agggagagcg tcgtccgatg cccttgagag ccttcaacct 1920  
agtcagctcc ttcgggtggg cgcggggcat gactatcgtc gccgcactta tgactgtctt 1980  
ctttatcatg caactcgtag gacaggtgcc ggcagcgctc tgggtcattt tcggcgagga 2040  
ccgctttcgc tggagcgga cgatgatcg cctgtcgctt gcggtattcg gaatcttgca 2100  
cgccctcgct caagccttcg tcaactggctc cgccaccaa cgtttcggcg agaagcaggc 2160  
cattatcgcc ggcatggcgg ccgacgcgct gggctacgtc ttgctggcgt tcgcgacgcg 2220

aggctggatg gccttcccca ttatgattct tctcgcttcc ggcggcatcg ggatgcccgc 2280  
gttgcaggcc atgctgtcca ggcaggtaga tgacgaccat caggacagc ttcaaggatc 2340  
gctcgcggt cttaccagcc taacttcgat cattggaccg ctgatcgtca cggcgattta 2400  
tgccgcctcg gcgagcacat ggaacgggtt ggcatggatt gtaggcgccg ccctatacct 2460  
tgtctgcctc cccgcgttgc gtcgcggtgc atggagccgg gccacctcga cctgaatgga 2520  
agccggcggc acctcgctaa cggattcacc actccaagaa ttggagccaa tcaattcttg 2580  
cggagaactg tgaatgcgca aaccaaccct tggcagaaca tatccatcgc gtccgccatc 2640  
tccagcagcc gcacgcggcg catctcgggc agcgttgggt cctggccacg ggtgcgcgcatg 2700  
atcgtgctcc tgtcgttgag gactagaatt gatctcctcg accgccaatt gggcatctga 2760  
gaatcatctg cgtttctcgc acgcaacgta cttgcaacgt tgcaactcct agtgttgtga 2820  
atcacacccc accgggggggt gggattgcag tcaccgattt ggtgggtgcg cccaggaaga 2880  
tcacgtttac ataggagctt gcaatgagct actccgtggg acaggtggcc ggcttcgccg 2940  
gagtgcgggt gcgcacgctg caccactacg acgacatcgg cctgctcgta ccgagcgagc 3000  
gcagccacgc gggccaccgg cgctacagcg acgccgacct cgaccggctg cagcagatcc 3060  
tgttctaccg ggagctgggc ttcccgtcgc acgaggtcgc cgccctgctc gacgaccgg 3120  
ccgcggaccc gcgcgcgcac ctgcgcgcgc agcacgagct gctgtccgcc cggatcggga 3180  
aactgcagaa gatggcgggc gccgtggagc aggcgatgga ggcacgcagc atgggaatca 3240  
acctacccc ggaggagaag ttcgaggtct tcggcgactt cgaccccgac cagtacgagg 3300  
aggaggtccg ggaacgctgg gggaacaccg acgcctaccg ccagtccaag gagaagaccg 3360  
cctcgtacac caaggaggac tggcagcgca tccaggacga ggccgacgag ctcaccggc 3420  
gcttcgtcgc cctgatggac gcgggtgagc ccgccgactc cgagggggcg atggacgccg 3480  
ccgaggacca ccggcagggc atcgcccgca accactacga ctgcgggtac gagatgcaca 3540  
cctgcctggg cgagatgtac gtgtccgacg aacgtttcac gcgaaacatc gacgccgcca 3600  
agccgggcct cgccgcctac atgcgcgacg cgatcctcgc caacgccgtc cggcacaccc 3660  
cctgagcgggt ggtcgtggcc cgggtctccc gcccggtctc accccacggc tcaactccgg 3720  
gccagacca ccgccgtccc gtacgcgcac acctcgggtgc ccacgtccgc cgcctccgtc 3780  
acgtcgaac ggaagatccc cgggtaccga gctcgtcagg tggcactttt cggggaaatg 3840  
tgcgcggaac ccctatttgt ttatTTTTCT aaatacatc aaatatgtat ccgctcatga 3900  
gacaataacc ctgataaatg cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac 3960  
atttcgtgt cgcccttatt ccctTTTTTG cggcattttg ccttcctggt tttgctcacc 4020

cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt ggggtgcacga gtgggtttaca 4080  
tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgtttttc 4140  
caatgatgag cactttttaa gttctgctat gtggcgcggt attatcccgt attgacgccg 4200  
ggcaagagca actcggtcgc cgcatacact attctcagaa tgacttggtt gagtactcac 4260  
cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgccca 4320  
taacatgag tgataacact gcggccaact tactttctgac aacgatcgga ggaccgaagg 4380  
agctaaccgc ttttttgac aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cgttggggaac 4440  
cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg 4500  
caacaacggt gcgcaaacta ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat 4560  
taatagactg gatggaggcg gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gcccttcagg 4620  
ctggctggtt tattgctgat aaatctggag cgggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg 4680  
cagcactggg gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acgggggagtc 4740  
aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc 4800  
attggtaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt 4860  
tttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt 4920  
aacgtgagtt ttcgtttcac tgagcgtcag acccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt 4980  
gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaacca ccgctaccag 5040  
cgggtggtttg tttgccggat caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca 5100  
gcagagcgca gataccaaat actgttcttc tagtgtagcc gtagttaggc caccacttca 5160  
agaactctgt agcacgcct acatacctcg ctctgctaatt cctgtttacca gtggctgctg 5220  
ccagtggcga taagtcgtgt ctaccgggt tggactcaag acgatagtta ccggataagg 5280  
cgcagcggtc gggctgaacg gggggttcgt gcacacagcc cagcttgag cgaacgacct 5340  
acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga 5400  
gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc 5460  
ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg 5520  
agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg 5580  
cggccttttt acggttcctg gccttttgct ggcccttttg tcacatgttc tttcctgcgt 5640  
tatcccctga ttctgtggat aaccgtatta ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc 5700  
gcagccgaac gaccgagcgc agcgagtcag tgagcgagga agcggaagag cgcccaatac 5760  
gcaaaccgcc tctccccgcg cgttggccga ttcattaatg cagctggcac gactagagtc 5820

ccgctgaggc ggcgtagcag gtcagccgcc ccagcgggtg tcaccaaccg ggggtggaacg 5880  
gcgccggtat cgggtgtgtc cgtggcgctc attccaacct ccgtgtgttt gtgcaggttt 5940  
cgctgtttgc agtccctcgc accggcaccg gcagcgaggg gctcacgggt gccggtgggt 6000  
cgactagttc agtgatggtg atggatgatgt cctcgagatc taagcttgga tccgcggccg 6060  
ctacgtagaa ttcccatatg tataatctct tcttaaagt aaacaaaatt atttctagac 6120  
gccgtccacg ctgcctcctc acgtgacgtg aggtgcaagc ccggacgttc cgctgccac 6180  
gccgtgagcc gccgcgtgcc gtcggctccc tcagcccggg cggccgtggg agcccgcctc 6240  
gatatgtaca ccgagaagc tcccagcgtc ctctggggc gcgatactcg accaccacgc 6300  
acgcacaccg cactaacgat tcggccggcg ctcgattcgg ccggcgctcg attcgccgg 6360  
cgctcgattc ggccggcgct cgattcggcc ggcgctcgat tcggccgagc agaagagtga 6420  
acaaccaccg accacgcttc cgctctgcgc gccgtaccg acctacctc cgcagctcga 6480  
agcagctccc gggagtaccg ccgtactcac ccgcctgtgc tcaccatcca ccgacgcaa 6540  
gcccacccg agcacacctc ttgcaccaag gtgccgaccg tggctttccg ctgcagggt 6600  
tccagaagaa atcgaacgat ccagcgcggc aaggttcaaa aagcaggggt tgggtgggag 6660  
gaggttttgg ggggtgtcgc cgggatacct gatatggctt tgttttgcgt agtcgaataa 6720  
ttttccatat agcctcggcg cgtcggactc gaatagttga tgtggcgggg cacagttgcc 6780  
ccatgaaatc cgcaacgggg ggctgtctga gcgatcggca atgggcggat gcggtgttgc 6840  
ttccgcaccg gccgttcgcg acgaacaacc tccaacgagg tcagtaccgg atgagccgcg 6900  
acgacgcatt ggcaatgcgg tacgtcgagc attcaccgca cgcgttgctc ggatctatcg 6960  
tcctcgactg cgatcacgtt gacgccgcga tgcgcgcatt cgagcaacca tccgaccatc 7020  
cggcgccgaa ctgggtcgca caatcgccgt ccggccgcgc acacatcgga tgggtggctcg 7080  
gccccaacca cgtgtgccgc accgacagcg cccgactgac gccactgcgc tacgcccacc 7140  
gcatcgaaac cggcctcaag atcagcgctg gcggcgatth cgcgtatggc gggcaactga 7200  
ccaaaaaccg gattcaccgc gattgggaga cgatctacgg cccggccacc ccgtacacat 7260  
tgccgcagct ggccaccatc cacacacccc ggcagatgcc gcgtcggccc gatcgggccc 7320  
tgggcctggg ccgcaacgtc accatgttcg acgccaccg gcgatgggca taccgcagat 7380  
gggtggcaaca ccgaaacgga accggccgcg actgggacca tctcgtcctg cagcactgcc 7440  
acgccgtcaa caccgagttc acgacaccac tgccgttcac cgaagtacgc gccaccgcgc 7500  
aatccatctc caaatggatc tggcgcaatt tcaccgaaga acagtaccga gcccgacaag 7560  
cgcatctcgg tcaaaaaggc ggcaaggcaa cgacactcgc caaacaagaa gccgtccgaa 7620

acaatgcaag aaagtacgac gaacatacga tgcgagaggc gattatctga tgggcggagc 7680  
caaaaatccg gtgcgccgaa agatgacggc agcagcagca gccgaaaaat tcggtgcctc 7740  
cactcgcaaca atccaacgct tgtttgctga gccgcgtgac gattacctcg gccgtgcgaa 7800  
agctcgccgt gacaaagctg tcgagctgcg gaagcagggg ttgaagtacc gggaaatcgc 7860  
cgaagcgatg gaactctcga ccgggatcgt cggccgatta ctgcacgacg cccgcaggca 7920  
cggcgagatt tcagcggagg atctgtcggc gtaaccaagt cagcgggttg tcgggttccg 7980  
gccggcgctc ggcaactcgga ccggccggcg gatggtgttc tgcctctggc gcagcgtcag 8040  
ctaccgccga aggcctgtca tcgaccggct tcgactgaag tatgagcaac gtcacagcct 8100  
gtgattggat gatccgctca cgctcgaccg ctacctgttc agctgccgcc cgctgggcat 8160  
gagcaacggc caactctcgt tcaa 8184

<210> 57

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN389

<400> 57

gttgtacaag catggggact cgccgc

26

<210> 58

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN390

<400> 58

gtagatctcc tccgactgca tcaacggcg

29

<210> 59

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN391

<400> 59

accgttaacc atcagtactt ggcggtgtg

29

<210> 60

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN321

<400> 60

gaagctgacc aagttctc

18

<210> 61

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN335

<400> 61

gcccagggca catcggaatt catg

24

<210> 62

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN336

<400> 62

accgacactg acgccgatga acga

24

<210> 63

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN349

<400> 63

cagcatgaac gtgatgagga atgtcagaag

30

<210> 64

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>



<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN351

<400> 64

ttcgaggtct tgctggtcac acgcatcgtg

30

<210> 65

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN361

<400> 65

aagagctctc tagacgcac cgaaacctcc accc

34

<210> 66

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN362

<400> 66

acaacatgaa ctcggatgtg c

21

<210> 67

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN363

<400> 67

ccggactcat accggacatg g

21

<210> 68

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN364

<400> 68

aaactagtca tggtcgctgt agtggaactc ac

32

<210> 69

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN368

<400> 69

aacgttgctt ttatgttgga tc

22

<210> 70

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN373

<400> 70

aatgtacaag ttaacgaccg cgcgggtccc ggacg

35

<210> 71

<211> 95

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer MCS-1a

<400> 71

catggggccac catcaccatc accatatggg aattctacgt agcggccgcg gatccaagct 60

tagatctctc gagcatcacc atcaccatca ctgaa

95

<210> 72

<211> 95

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer MCS-1b

&lt;400&gt; 72

ctagttcagt gatggtgatg gtgatgctcg agagatctaa gcttggatcc gcggccgcta 60  
cgtagaattc ccatatggtg atggtgatgg tggcc 95

&lt;210&gt; 73

&lt;211&gt; 98

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:primer MCS-2a

&lt;400&gt; 73

tatgggccat caccatcacc atcacgccat gggaattcta cgtagcggcc gcggatccaa 60  
gcttagatct ctcgagcatc accatcacca tcactgaa 98

&lt;210&gt; 74

&lt;211&gt; 100

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:primer MCS-2b

&lt;400&gt; 74

ctagttcagt gatggtgatg gtgatgctcg agagatctaa gcttggatcc gcggccgcta 60  
cgtagaattc ccatggcgtg atggtgatgg tgatggccca 100

&lt;210&gt; 75

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN217

<400> 75

tgacgcgctc cattatacct cctcacgtg

29

<210> 76

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN218

<400> 76

gagaagggag cggccatggc

20

<210> 77

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN395

<400> 77

tttgtaaact agagtaacgg gctactccg

29

<210>-78

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN396

<400> 78

aaggtacctc aacgacagga gcacgac

28

<210> 79

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN397

<400> 79

actgttaacg catccgaaac ctccacccca etc

33

<210> 80

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN398

<400> 80

ttgttacctc gctgtagtgg aactcaccga gcac

34

<210> 81

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN147

<400> 81

cgtgtacata tcgaggcggg ctccca

26

<210> 82

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN376

<400> 82

tttctagacg ccgtccatta tacctcctca cgtg

34

<210> 83

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN388

<400> 83

aaagttaacg agagttggcc gttgctc

27

<210> 84

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN120

<400> 84

gctgtacacc cgagaagctc ccagcg

26

<210> 85

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN160

<400> 85

aacatatgta tatctccttc ttaaagttaa ac

32

<210> 86

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>



<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN337

<400> 86

aaccatggct agcaaaggag aagaact

27

<210> 87

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN338

<400> 87

aagtgttggc caaggaacag gtag

24

<210> 88

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN339

<400> 88

gtcactactt tctcttatgg

20

<210> 89

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer sHN340

<400> 89

ttagatcttt agtgatggtg atggtgatgt ttgtagagct catccatgcc atgtg 55

<210> 90

<211> 5987

<212> DNA

<213> Rhodococcus erythropolis

<220>

<223> endogenous plasmid pRE8424

<400> 90

gaattcgcgt tgaagcccgg cctctcgtag ctccattgcg acagtcgtgg agtcgtgcgc 60  
gttttgaatg gtctgccagg agtgcgacag atccacagat gcctgcttga tgacctgcat 120  
ctttcgttcg gtttctttgc gttgaatcat cgcgcgaaacc tctttctcgt ccatacggac 180  
agcttattga gtgatcaacc acaaaaagtg tgcagtcggt gacggtttgt gcagcaactg 240  
gacactacgc gatattatgt gtacggtttg aagtgtagat gaacagggtg tgctgaatat 300  
ggacacttaa gtcataagct gtatcggact cgatcgaagg aactcgcag aatgttcagc 360  
tcggaacgtc cctccccgtc gcaactaccg ctgatcagtt cccggtgttc gtggccggta 420  
tggaacgacc gatcaagccg gtgcaggaca agctcactcc cgatgggcgt gtgaagtatt 480  
cgactggtgc actgctccga gttgcacgca aagatggaac tgttgcgacg gataagacag 540  
catccgtgca cgtcatcaac ccgccgaatg agccgttcag cttcggcacg atctaccgag 600  
cagaaggcct tgtctgggtg cagccctaca tgacgggaat ggatcgtctc gactgtcca 660  
tcacggtcga gaacctggtt ccaatgcctg cggcggccgt ctccgcacct gctcgtgaaga 720  
gcgcggacgc atgacaaagc tggtttcacg aatcgcgata ccggttggtg ccttgctagt 780  
cggactgatt gttggtctga atattgttgg cacacaagag attaagcttt ccagcggaat 840

gcaagagcgt cgggactcat gggctgaacg aacggtgacc tgggtgcagat ctcctcttcc 900  
gacaggttct gttccatctg tcagtgcacg cagagagata ccgggatatg tccgagtgag 960  
tccggaattg agcgccgatg ggatccagtg gactaacccc gatggacagg tcatcacgtc 1020  
gccgtactcg aagaccagta cctgcgggtga tgttccagtt cccgaagggt ggcgcgagcgt 1080  
ctatttgacc gtaaacagcc ctgtcccggg ctacaacgga acggaggctg agactgtccc 1140  
agaaacattg acgagcgagc gaggcacaac caatctccag cttggaacct ccggatgcgc 1200  
tcttgtgccg gtcgagtcgt ggttgtggaa cgtggatgag caggctcagg tagatagtcc 1260  
gaatgtcgtt gtggagtggc cccgatgagc aattacgaag ccgttcggcg cggtgaccag 1320  
gtacgaaggc gtacaacctg gcaaatcatg cgaggaaagc tcaaggcaaa aattgccgat 1380  
taccgattc tgtcctcgac gtttctgttg cttctcgtgc tgtacatctt cgacgctgag 1440  
atgtggctct tggccagtgt gctgctgggtg tgcgttgtgg caatggtcta cctgagagac 1500  
cgaacgaagg ctcgcgccgc caaacgtcgt acagctcgat ggtggcgagg aactccggaa 1560  
gttgcagggt ctgcggccaa tctcggctctg atcaattcct ctggacagcc tcctctcatt 1620  
cggagttata aattttcgga cgacggattg actcgatcag tcgctttcga ccttcgcaca 1680  
ggcatcactg gggaagacat gacatcgaac acggtaaaaa tagctgatgc tttcgggtgct 1740  
ctacgtgccg gtttcaccaa agtagagccg cgcagggttg agctacttct gatcgacgca 1800  
gacactatct ctcaagcacg agatgcagca tggctcagtg acgtcgagga ctcacggcc 1860  
ggcacattga aggaagaggc cggcgccata cttggggaca atcggccttg gtgggagcaa 1920  
gaaaaggatc ttccgttcga caaaagcacg gacgcctgat ggatcaaaca gacacgatcc 1980  
cgattgcgat tggatggaac gaactagccc aacctgtcct ggtcgatata gccaaagatg 2040  
ctgctcactg gctcattcaa ggcaaaaccc gttccggaaa atctcaatgc acctacaacc 2100  
tgctcgaca ggctggatcg aatcccgtg tgcgtgtcgt cggagtcgat ccacttccg 2160  
tcttactagc ccattcgtc caccgaagac ccgctgaacc gaacatcgag ctcgactga 2220  
acgattttga caaagtcctc cgagtcctcc agttcgtcaa agcagaatcc gaccgacgaa 2280  
ttgagtgttt ctgggatcga cgcatagaca aaatttcttt gttctcgcca gcactacctc 2340  
tcactctgct tgtactggaa gaatttcccg gaatcatcga gggcgcacag gatttcgatg 2400  
caaccaacgg tctgaaacca gcagatagat acgcaccccg catcacatcg cttgttcgac 2460  
agattgctgc tcagtcggcc aaagcaggca tcagaatggt gctcttggct caacgtgcgg 2520  
aagcttccat cgtgggcgga aacgctcgtc cgaatttcgc ggtgaaaatg actctccgcg 2580  
tagacgaacc tgaatctgtc aaaatgctgc accccaacgc aacacctgaa gaggcgcac 2640

tggctgaagg attcggttcct ggacaaggct tcttcgacca acccggacta cggcgccaaa 2700  
tgatccgaac ggttcgcgta ggtgagtact cgacctacgc gagttacgtc gaaaacgcag 2760  
acctcgcgta tgaagccgca ctgaacatcg accgagcaca acgaatgaca atcgccctcgg 2820  
aatacccaca tcttggcgac ataggctgac aaccgaacac acaggaggac ataccttgat 2880  
cggctacccg acagacgcaa tcccggtaaa cacctatatt cgacagcaat ttgagaagggt 2940  
tgcacatgag gcaggagaaa aacttgcttc acgccgaaac ctgcccacgg aacgagtcgt 3000  
aacgactgca ctccggatca aatcaggctg gccgaatgat catctcgtaa taactgaaat 3060  
actcagggcc agagtagggt tggaagggtca agctgtcgtt gacgaacttc gcggcatgca 3120  
gatcacgat gacgaccttg gtgcactagt cgggccacga tgggtcagtt cgatgaccgt 3180  
gttcgcaatg tctgagctgc ttctaggcga tgaactcgga aagctcaacg atttacgcgg 3240  
tgacgattgg aaacgtgcta gtgactcagc tgctgaagtt ggacgatcac tgggccttaa 3300  
atacgacatt tcggacagcg agggagccga acgagattgg tgcgctgctc gaggggcggc 3360  
atgggctgtc gcaatgcatg aacacctga gggacgcgat ttcgaaactc tgactgcacc 3420  
gtggatcagt cttgtccgac cgaagtctgt tcaactcttc atggacaatg ctgatcgacc 3480  
gtcatttggt gccaggtct acgacgagct atgcagccat tctggaggtc atgcaattct 3540  
gagtgcagca gatcagaggg ttgatgcgtg aagcacgaag ctacggtatt catccttcgt 3600  
ctagctgtcg gcatttacga tcatcgcggt cctgatctgt ggggtggaca tgatgtctac 3660  
ggttggattt acgctgggtga acgcgctgaa tcgtctgaaa ttcttgctgc gatgtgctgc 3720  
tattacaccc ccgactacgc ccgtgaagcc ggattcgaca ttgaagcact ggggtgaatac 3780  
cggggctctgt tcgatgcact ggtgaagaca agcagaaccc cggaagagaa ggctggcggt 3840  
gtcgaagcat ggggactcgc cgcggactag cggcttcccg acacgccgta ctgaccagca 3900  
gatcagcgat aaacgctggt tctgctgggt aagtggataa aaaccaaata atcgatgaac 3960  
ctcgaagtgg agtatccgag ctgaactagc tggatttact ccgaaaatac gagcggcgac 4020  
gaagggtggt ggaccaccct gccgccgct tcgaggctcc tacttgacta ggaccccgct 4080  
cgttatgacc agcgtaagtg ctgaacacct ttccggcaaa gaccggcccc ctgtcctcgt 4140  
gtcgtccgat aagcgcggca tccggcacga acttcgaccc aaacttcaac aaatcaccac 4200  
gtcagaaact tttaatgcgt gcggccggcc gatttcgggc gtgaacggtg tgaccatcgt 4260  
caacggtccc aaagggtccg gatttggagg ccttcgctcc tgcggaaagg gctggatctg 4320  
cccctgctgt gcgggaaaag tcggcgcaca tcgagcagac gaaatttctc aagttgttgc 4380  
tcatcaactc gggactggat ctgttgcgat ggtgaccatg accatgcgcc ataccgctgg 4440

gcagcgtttg catgatttgt ggactggact ttcggcagcc tggaaagctg cgaccaatgg 4500  
ccgccgatgg cgtaccgaac gtgaaatgta cggctgcgac ggatacgtac gagctgttga 4560  
aatcactcac ggaaaaaacg gttggcacgt tcacgtccac gctctactca tgttcagcgg 4620  
tgacgtgagt gagaacatcc tcgaatcctt ctcggatgcg atgttcgata ggtggacctc 4680  
caaactcgtg tctctgggat ttgctgcgcc actacgtaat tcaggtggac tcgacgtaag 4740  
aaagattggg ggagaagctg accaagttct cgtgcatac ctgacgaaa ttgcatccgg 4800  
ggtcggcatg gaagtcggca gtggcgacgg aaaaagtggg cggcacggca accgtgcacc 4860  
ttgggaaatc gccgttgatg cagtcggagg ggatccacaa gcgttggaaac tctggcgcca 4920  
gttttgagttc ggttcgatgg gacgccgagc aatcgcatgg tctcgtggac tgcgcgccc 4980  
agctggtctt ggcgtagaac tcacggatgc tcagattgtc gaacaggaag aatctgcccc 5040  
ggtcatgggt gcgatcattc cggctcggtc ctggatgatg attcggaact gtgcgcctta 5100  
cgttttcgga gagatccttg gactcgtgga agcgggcgcg acctgggaaa accttcgtga 5160  
ccacttgcat tatcgattgc ctgcagcgga tgtgcggcct ccgataatat cgattcgtaa 5220  
gtgaaatgtc ttggtgtgca acaactttca ctcgtatgaa ccacacttga gggcatcccc 5280  
ccgatacttg ccgctttgaa gctgggtgtc tctctgtcag ggctgcgata gcaccgcgta 5340  
gcggccttggc cttgacagag agacggcctg tttcatgggt ggtctcgggg ggctgaccgg 5400  
gcagatagaa aaaggccggc cgatttggct gccgactatt tttgcaggta aaccatctc 5460  
atgagcatca atgaacgtcc cgttggtatc gcagcgaatg cagcttcggg agacgtcgat 5520  
ggcgttgtga tgggtgtgta tctctcgctt tatgggcaag aatcacgct agatcgagat 5580  
gatgcgttcc tactcctcga tcgacttcag gacgcgttgc gacctcaagc caactaagaa 5640  
ccctccagat ggtctaaacg aggcgcaaac tcgctcctgg gcctgcgggc ggagcaccga 5700  
agcgcgagcg aagcggagcg cgtaggtggg ggagcctgcg ggcagcggcg gcggagccgc 5760  
cgcccttgga ataggtgatc atcggggcca tagcaggta gaggatgttt ttacgatgac 5820  
tcatgctcac cacgccaagt actgatggc gacgggtgaaa catctgcaac ggtggcaacg 5880  
gttcggctgc tgacgtcaag ctcgtcaacg agaaaacgag aatggattt gcgcagctca 5940  
gaggcagttc ccactactga tgtgatgtct gccagagcct gtagcca 5987

&lt;210&gt; 91

&lt;211&gt; 8207

&lt;212&gt; DNA

## &lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:vector pTip-QT1

&lt;400&gt; 91

gagctcgacc ggcggggtcc cggacgggga agagcgggga gctttgccag agagcgacga 60  
cttccccttg cgttggtgat tgccggtcag ggcagccatc cgccatcgtc gcgtagggtg 120  
tcacacccca ggaatcgct cactgaacac agcagccggt aggacgacca tgactgagtt 180  
ggacaccatc gcaaattcgt ccgatcccgc ggtgcagcgg atcatcgatg tcaccaagcc 240  
gtcacgatcc aacataaaga caacgttgat cgaggacgtc gagcccctca tgcacagcat 300  
cgcgggccggg gtggagttca tcgaggtcta cggcagcgac agcagtcctt ttccatctga 360  
gttgctggat ctgtgcgggc ggcagaacat accggtccgc ctcatcgact cctcgatcgt 420  
caaccagttg ttcaaggggg agcgggaaggc caagacattc ggcatcgccc gcgtccctcg 480  
cccggccagg ttcggcgata tcgcgagccg gcgtggggac gtcgtcgttc tcgacggggg 540  
gaagatcgtc gggaacatcg gcgcgatagt acgcacgtcg ctgcgctcg gagcgtcggg 600  
gatcatcctg gtggacagt acatcaccag catcgcgga cggcgtctcc aaagggccag 660  
ccgaggttac gtcttctccc ttcccgtcgt tctctccggt cgcgaggagg ccatcgccct 720  
cattcgggac agcggtatgc agctgatgac gctcaaggcg gatggcgaca tttccgtgaa 780  
ggaaactcggg gacaatccgg atcggtggc cttgctgttc ggcagcgaaa aggggtgggcc 840  
ttccgacctg ttcgaggagg cgtcttccgc ctcggtttcc atcccatga tgagccagac 900  
cgagtctctc aacgtttccg tttccctcgg aatcgcgctg cacgagagga tcgacaggaa 960  
tctcgcggcc aaccgataag cgcctctgtt cctcggacgc tcggttcctc gacctcgatt 1020  
cgtcagtgat gatcacctca cacggcagcg atcaccactg acatatcgag gtcaacggtc 1080  
gtggtccggg cgggcactcc tcgaaggcgc ggccgacgcc cttgaacgac tcgatgactc 1140  
tagagtaacg ggctactccg tttaacggac ccggttctca cgcttttaggc ttgaccccgg 1200  
agcctgcatg gggcattccg ccgtgaaccc ggtggaatgc ccccggcacc cgggctttcc 1260  
agcaaagatc acctggcgcc gatgagtaag gcgtacagaa ccaactccaca ggaggaccgt 1320  
cgagatgaaa tctaacaatg cgtcatcgt catcctcggc accgtcacc tggatgctgt 1380  
aggcataggc ttggttatgc cggctactgc gggcctcttg cgggatatcg tccattccga 1440

cagcatcgcc agtcactatg gcgtgctgct agcgctatat gcgttgatgc aatttctatg 1500  
cgaccccggtt ctcgagacac tgtccgaccg ctttggccgc cgcccagtc tgcctgcttc 1560  
gctacttggga gccactatcg actacgcgat catggcgacc acaccggtcc tgtggattct 1620  
ctacgccgga cgcacgtgg ccggcatcac cggcgccaca ggtgcggttg ctggcgcccta 1680  
tatcgccgac atcacgatg gggaagatcg ggctcgccac ttggggctca tgagcgcttg 1740  
tttcggcggtg ggtatgggtg caggccccgt ggccggggga ctgttgggcg ccatctcctt 1800  
gcatgcacca ttccttgccg cggcggtgct caacggcctc aacctactac tgggctgctt 1860  
cctaattgcag gagtcgcata agggagagcg tcgtccgatg cccttgagag ccttcaaccc 1920  
agtcagctcc ttccggtggg cgcggggcat gactatcgtc gccgcaetta tgaactgtctt 1980  
ctttatcatg caactcgtag gacaggtgcc ggcagcgctc tgggtcattt tcggcgagga 2040  
ccgctttcgc tggagcgoga cgatgatcgg cctgtcgctt gcggtattcg gaatcttgca 2100  
cgccctcgct caagccttcg tcaactggctc cgccaccaa cgtttcggcg agaagcaggc 2160  
cattatcgcc ggcatggcgg ccgacgcgtt gggctacgtc ttgctggcgt tcgcgacgcg 2220  
aggctggatg gccttcccc ttatgattct tctcgcttcc ggcggcacgc ggatgccgcg 2280  
gttcgagcc atgctgtcca ggcaggtaga tgacgacct caggacagc ttcaaggatc 2340  
gctcgcggtt cttaccagcc taacttcgat cattggaccg ctgatcgta cggcgattta 2400  
tgccgcctcg gcgagcacat ggaacgggtt ggcatggatt gtaggcgcg ccctatacct 2460  
tgtctgcctc cccgcgttgc gtcgcggtgc atggagccgg gccacctcga cctgaatgga 2520  
agccggcggc acctcgctaa cggattcacc actccaagaa ttggagccaa tcaattcttg 2580  
cggagaactg tgaatgcgca aaccaaccct tggcagaaca tatccatcgc gtccgccatc 2640  
tccagcagcc gcacgcggcg catctcgggc agcgttgggt cctggccacg ggtgcgcatg 2700  
atcgctgctc tgcgttgag gactagaatt gatctcctcg accgccaatt gggcatctga 2760  
gaatcatctg cgtttctcgc acgcaacgta cttgcaacgt tgcaactcct agtgttgtga 2820  
atcacacccc accggggggt gggattgcag tcaccgattt ggtgggtgcg ccaggaaga 2880  
tcacgtttac ataggagctt gcaatgagct actcgtggg acaggtggc ggcttcgcg 2940  
gagtgcggt gcgcacgtg caccactacg acgacatcgg cctgctcgta ccgagcgagc 3000  
gcagccacgc gggccaccgg cgctacagcg acgccgacct cgaccggctg cagcagatcc 3060  
tgttctaccg ggagctgggc ttcccgctcg acgaggtcgc cgccctgctc gacgaccgg 3120  
ccgcggaccc gcgcgcgcac ctgcgcgcc agcacgagct gctgtccgc cggatcggga 3180  
aactgcagaa gatggcggcg gccgtggagc aggcgatgga ggcacgcagc atgggaatca 3240

acctcacccc ggaggagaag ttcgaggtct tcggcgactt cgaccccgac cagtacgagg 3300  
aggaggtccg ggaacgctgg gggaacaccg acgcctaccg ccagtccaag gagaagaccg 3360  
cctcgtacac caaggaggac tggcagcgca tccaggacga ggccgacgag ctcacccggc 3420  
gcttcgtcgc cctgatggac gcgggtgagc ccgccgactc cgagggggcg atggacgccg 3480  
ccgaggacca ccggcagggc atcgcccgca accactacga ctgcgggtac gagatgcaca 3540  
cctgcctggg cgagatgtac gtgtccgacg aacgtttcac gcgaaacatc gacgccgcca 3600  
agccgggcct cgccgcctac atgcgcgacg cgatcctcgc caacgccgtc cggcacaccc 3660  
cctgagcggg ggtcgtggcc cgggtctccc gcccggtctc accccacggc tcaactccgg 3720  
gccacgacca ccgccgtccc gtacgcgcac acctcggtgc ccacgtccgc cgcctccgtc 3780  
acgtcgaaac ggaagatccc cgggtaccga gctcgtcagg tggcactttt cggggaaatg 3840  
tgcgcggaac ccctatttgt ttatttttct aaatacattc aaatatgtat ccgctcatga 3900  
gacaataacc ctgataaatg cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac 3960  
atttcctgtg cgcccttatt cccttttttg cggcattttg ccttcctgtt tttgctcacc 4020  
cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt ggggtgcacga gtgggttaca 4080  
tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc 4140  
caatgatgag cactttttaa gttctgctat gtggcgcggt attatccgt attgacgccg 4200  
ggcaagagca actcggtcgc cgcatacact attctcagaa tgacttggtt gagtactcac 4260  
cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca 4320  
taaccatgag tgataacact gcggccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg 4380  
agctaaccgc ttttttgac aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaac 4440  
cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg 4500  
caacaacgtt gcgcaaacta ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat 4560  
taatagactg gatggaggcg gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg 4620  
ctggctggtt tattgctgat aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg 4680  
cagcactggg gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc 4740  
aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc 4800  
attggtaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt 4860  
tttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt 4920  
aacgtgagtt ttcgttcac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt 4980  
gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaacca ccgctaccag 5040



cggtggtttg tttgccggat caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca 5100  
gcagagcgca gataccaaat actgttcttc tagttagacc gtagttaggc caccacttca 5160  
agaactctgt agcacgcct acatacctcg ctctgctaata cctgttacca gtggctgctg 5220  
ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt tggactcaag acgatagtta ccggataagg 5280  
cgcagcggtc gggctgaacg gggggttcgt gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct 5340  
acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga 5400  
gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc 5460  
ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg 5520  
agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg 5580  
cggccttttt acggttctcg gccttttgct ggccttttgc tcacatgttc tttcctgcgt 5640  
tatcccctga ttctgtggat aaccgtatta ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc 5700  
gcagccgaac gaccgagcgc agcgagtcag tgagcgagga agcggaagag cgccaatac 5760  
gcaaaccgcc tctccccgcg cgttggccga ttcattaatg cagctggcac gactagagtc 5820  
ccgctgaggc ggcgtagcag gtcagccgcc ccagcgggtg tcaccaaccg gggtggaacg 5880  
gcgccggtat cgggtgtgtc cgtggcgctc attccaacct ccgtgtgttt gtgcaggttt 5940  
cgcgtgttgc agtccctcgc accggcaccc gcagcgaggg gctcacgggt gccggtgggt 6000  
cgactagtgc agtgatggtg atggtgatgc tcgagagatc taagcttgga tccgcggccg 6060  
ctacgtagaa ttcccatatg gtgatggtga tgggtggcca tggatatct ccttcttaa 6120  
gttaaacaaa attatttcta gacgccgtcc acgctgcctc ctcacgtgac gtgaggtgca 6180  
agcccgagc ttccgcgtgc cagccgtga gccgccgct gccgtcggct ccctcagccc 6240  
gggcggccgt gggagccgc ctcgatatgt acaccgaga agctcccagc gtcctcctgg 6300  
gccgcgatac tcgaccacca cgcacgcaca ccgcactaac gattcggccg gcgctcgatt 6360  
cggccggcgc tcgattcggc cggcgctcga ttcggccggc gctcgattcg gccggcgctc 6420  
gattcggccg agcagaagag tgaacaacca ccgaccagc ttcgctctg cgcgccgtac 6480  
ccgacctacc tccgcagct cgaagcagct cccgggagta ccgccgtact caccgcctg 6540  
tgctcaccat ccaccgagc aaagcccaac ccgagcacac ctcttgacc aaggtgccga 6600  
ccgtggcttt ccgctcgcag ggttccagaa gaaatcgaac gatccagcgc ggcaaggttc 6660  
aaaaagcagg ggttggtggg gaggaggttt tggggggtgt cgccgggata cctgatatgg 6720  
ctttgttttg cgtagtcgaa taattttcca tatagcctcg gcgcgtcgga ctggaatagt 6780  
tgatgtgggc gggcacagtt gcccatagaa atccgcaacg gggggcgtgc tgagcgatcg 6840

gcaatgggcg gatgcggtgt tgcttccgca ccggccgttc gcgacgaaca acctccaacg 6900  
 aggtcagtac cggatgagcc gcgacgacgc attggcaatg cggtagctcg agcattcacc 6960  
 gcacgcgttg ctccgatcta tcgtcatcga ctgcgatcac gttgacgccg cgatgcgcgc 7020  
 attcgagcaa ccatccgacc atccggcgcc gaactgggtc gcacaatcgc cgtccggccg 7080  
 cgcacacatc ggatggtggc tcggcccca ccaactgtgc cgcaccgaca gcgcccgaact 7140  
 gacgccactg cgctacgcc accgcatcga aaccggcctc aagatcagcg tcggcggcga 7200  
 tttcgcgtat ggccgggcaac tgaccaaaaa cccgattcac cccgattggg agacgatcta 7260  
 cggcccggcc accccgtaca cattgcggca gctggccacc atccacacac cccggcagat 7320  
 gccgcgtcgg cccgatcggg ccgtgggcct gggccgcaac gtcacatgt tcgacgccac 7380  
 ccggcgatgg gcataccgc agtgggtggc acaccgaaac ggaaccggcc gcgactggga 7440  
 ccatctcgtc ctgcagcact gccacgccgt caacaccgag ttacacacac cactgccgtt 7500  
 caccgaagta cgcgccaccg cgcaatccat ctccaaatgg atctggcgca atttcaccga 7560  
 agaacagtac cgagcccgac aagcgcattt cgggtcaaaa ggccggcaagg caacgacact 7620  
 cgccaaacaa gaagccgtcc gaaacaatgc aagaaagtac gacgaacata cgatgcgaga 7680  
 ggcgattatc tgatgggagg agccaaaaat ccggtgcgcc gaaagatgac ggcagcagca 7740  
 gcagccgaaa aattcgggtgc ctccactcgc acaatccaac gcttgtttgc tgagccgcgt 7800  
 gacgattacc tcggccgtgc gaaagctcgc cgtgacaaag ctgtcgagct gcggaagcag 7860  
 gggttgaagt accgggaaat cgccgaagcg atggaactct cgaccgggat cgtcggccga 7920  
 ttactgcacg acgcccgcag gcacggcgag atttcagcgg aggatctgtc ggcgtaacca 7980  
 agtcagcggg ttgtcgggtt ccggccggcg ctccggcactc ggaccggccg gcggtggtg 8040  
 ttctgcctct ggccgacggt cagctaccgc cgaaggcctg tcacgaccg gcttcgactg 8100  
 aagtatgagc aacgtcacag cctgtgattg gatgatccgc tcacgctcga ccgctacctg 8160  
 ttcagctgcc gcccgctggg catgagcaac ggccaactct cgttcaa 8207

<210> 92

<211> 8211

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

## &lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:vector pTip-QT2

&lt;400&gt; 92

gagctcgacc gcgcggggtcc cggacgggga agagcgggga gctttgccag agagcgacga 60  
cttcccccttg cgttggtgat tgccggtcag ggcagccatc cgccatcgtc gcgtaggggtg 120  
tcacacccca ggaatcgct cactgaacac agcagccggt aggacgacca tgactgagtt 180  
ggacaccatc gcaaattcgt ccgatcccgc ggtgcagcgg atcatcgatg tcaccaagcc 240  
gtcacgatcc aacataaaga caacgttgat cgaggacgtc gagccctca tgcacagcat 300  
cgcgcccggt gtggagttca tcgaggtcta cggcagcgac agcagtcctt ttccatctga 360  
gttgctggat ctgtgcgggc ggcagaacat accggtccgc ctcatcgact cctcgatcgt 420  
caaccagttg ttcaaggggg agcgggaaggc caagacattc ggcatcgccc gcgtccctcg 480  
cccggccagg ttcggcgata tcgcgagccg gcgtggggac gtcgtcgttc tcgacgggggt 540  
gaagatcgtc gggaacatcg gcgcgatagt acgcacgtcg ctcgcgctcg gagcgtcggg 600  
gatcatcctg gtggacagtg acatcaccag catcgcgga cggcgtctcc aaagggccag 660  
ccgaggttac gtctttctcc ttcccgctgt tctctccggt cgcgaggagg ccatcgctt 720  
cattcgggac agcggtatgc agctgatgac gctcaaggcg gatggcgaca tttccgtgaa 780  
ggaactcggg gacaatccgg atcggttggc cttgctgttc ggcagcgaaa aggggtgggccc 840  
ttccgacctg ttcgaggagg cgtcttccgc ctcggtttcc atcccatga tgagccagac 900  
cgagtctctc aacgtttccg tttccctcgg aatcgcgctg cacgagagga tcgacaggaa 960  
tctcgcgccc aaccgataag cgcctctgtt cctcggaagc tcggttcctc gacctcgatt 1020  
cgtcagtgat gatcacctca cacggcagcg atcaccactg acatatcgag gtcaacggtc 1080  
gtgggtccggg cgggcactcc tcgaaggcgc ggccgacgcc cttgaacgac tcgatgactc 1140  
tagagtaacg ggctactccg tttaacggac cccgttctca cgcttttaggc ttgaccccgg 1200  
agcctgcatg gggcattccg ccgtgaaccc ggtggaatgc ccccggcacc cgggctttcc 1260  
agcaaagatc acctggcgcc gatgagtaag gcgtacagaa ccaactccaca ggaggaccgt 1320  
cgagatgaaa tctaacaatg cgctcatcgt catcctcggc accgtcacc tggtatgctgt 1380  
aggcataggc ttggttatgc cgggtactgcc gggcctcttg cgggatatcg tccattccga 1440  
cagcatcgcc agtcactatg gcgtgctgct agcgtatat gcgttgatgc aatttctatg 1500  
cgcacccgtt ctcggagcac tgtccgaccg ctttggccgc cgcccagtc tgctcgcttc 1560  
gctacttggg gccactatcg actacgcgat catggcgacc acaccgtcc tgtggattct 1620

ctacgccgga cgcacgtgg ccggcatcac cggcgccaca ggtgcggttg ctggcgccta 1680  
tatcgccgac atcaccgatg gggaagatcg ggctcgccac ttctgggtca tgagcgcttg 1740  
tttcggcgtg ggtatggttg caggccccgt ggccggggga ctgttgggag ccatctcctt 1800  
gcatgcacca ttctttgagg cggcggtgct caacggcctc aacctactac tgggctgctt 1860  
cctaatagcag gagtcgcata agggagagcg tcgtccgatg cccttgagag ccttcaaccc 1920  
agtcagctcc ttccggtggg cgcggggcat gactatcgtc gccgcactta tgactgtctt 1980  
ctttatcatg caactcgtag gacaggtgcc ggcagcgctc tgggtcattt tcggcgagga 2040  
ccgctttcgc tggagcgga cgatgatcg cctgtcgctt gcggtattcg gaatcttgca 2100  
cgccctcgct caagccttcg tcactggtcc cgccaccaa cgtttcggcg agaagcaggc 2160  
cattatcgcc ggcatggcgg ccgacgcgct gggctacgtc ttgctggcgt tcgcgacgcg 2220  
aggctggatg gccttccccca ttatgattct tctcgcttcc ggcggcacgc ggatgcccgc 2280  
gttgcaggcc atgctgtcca ggcaggtaga tgacgaccat caggacagc ttcaaggatc 2340  
gctcgcggt cttaccagcc taacttcgat cattggaccg ctgatcgta cggcgattta 2400  
tgccgcctcg gcgagcacat ggaacgggtt ggcatggatt gtaggcgcgc ccctatacct 2460  
tgtctgctc cccgcgttgc gtcgcggtgc atggagccgg gccacctga cctgaatgga 2520  
agccggcggc acctcgctaa cggattcacc actccaagaa ttggagccaa tcaattcttg 2580  
cggagaactg tgaatgcga aaccaaccct tggcagaaca tatccatcg gtccgccatc 2640  
tccagcagcc gcacgcggcg catctcgggc agcgttgggt cctggccacg ggtgcgcacg 2700  
atcgtgctcc tgtcgttgag gactagaatt gatctcctcg accgccaatt gggcatctga 2760  
gaatcatctg cgtttctcgc acgcaacgta cttgcaacgt tgcaactcct agtgttgtga 2820  
atcacacccc accgggggggt gggattgcag tcaccgattt ggtgggtgcg ccaggaaga 2880  
tcacgtttac ataggagctt gcaatgagct actccgtggg acaggtggcc ggcttcgccg 2940  
gagtgcagggt gcgcacgctg caccactacg acgacatcg cctgctcgta ccgagcgagc 3000  
gcagccacgc gggccaccgg cgctacagcg acgccgacct cgaccggctg cagcagatcc 3060  
tgttctaccg ggagctgggc ttcccgctcg acgaggtcgc cgccctgctc gacgaccgg 3120  
ccgcggaccc gcgcgcgcac ctgcgcgcgc agcacgagct gctgtccgcc cggatcggga 3180  
aactgcagaa gatggcggcg gccgtggagc aggcgatgga ggcacgcagc atgggaatca 3240  
acctacccc ggaggagaag ttcgaggtct tcggcgactt cgaccccgac cagtacagg 3300  
aggaggtccg ggaacgctgg gggaacaccg acgcctaccg ccagtccaag gagaagaccg 3360  
cctcgtaac caaggaggac tggcagcgca tccaggacga ggccgacgag ctcaccggc 3420

gcttcgtcgc cctgatggac gcgggtgagc ccgccgactc cgagggggcg atggacgccg 3480  
ccgaggacca ccggcagggc atcgcccgca accactacga ctgcgggtac gagatgcaca 3540  
cctgcctggg cgagatgtac gtgtccgacg aacgtttcac gcgaaacatc gacgccgcca 3600  
agccgggcct cgccgcctac atgcgcgacg cgatcctcgc caacgccgtc cggcacaccc 3660  
cctgagcggg ggtcgtggcc cgggtctccc gcccggtctc accccacggc tcaactcccg 3720  
gccacgacca ccgccgtccc gtacgcgcac acctcggtgc ccacgtccgc cgcctccgtc 3780  
acgtcgaaac ggaagatccc cgggtaccga gctcgtcagg tggcactttt cggggaaatg 3840  
tgcgcggaac ccctatttgt ttatttttct aaatacatte aaatatgtat ccgctcatga 3900  
gacaataacc ctgataaatg cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac 3960  
atttcctgtg cgcccttatt cccttttttg cggcattttg ccttcctgtt tttgctcacc 4020  
cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt ggggtgcacga gtgggttaca 4080  
tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc 4140  
caatgatgag cacttttaaa gttctgctat gtggcgcggt attatccgt attgaagccg 4200  
ggcaagagca actcggtcgc cgcatacact attctcagaa tgacttggtt gagtactcac 4260  
cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca 4320  
taaccatgag tgataacact gcggccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg 4380  
agctaaccgc ttttttgac aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaac 4440  
cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg 4500  
caacaacggt gcgcaaacta ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat 4560  
taatagactg gatggaggcg gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg 4620  
ctggctgggt tattgctgat aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg 4680  
cagcactggg gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc 4740  
aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc 4800  
attggtaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt 4860  
tttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc ttttgataa tctcatgacc aaaatccctt 4920  
aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt 4980  
gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaacca ccgctaccag 5040  
cgggtggttg tttgccgat caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca 5100  
gcagagcgca gataccaaat actgttcttc tagtgtagcc gtagttaggc caccacttca 5160  
agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgctaata cctgttacca gtggctgctg 5220

ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt tggactcaag acgatatgta ccggataagg 5280  
cgacgcggtc gggctgaacg gggggttcgt gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct 5340  
acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga 5400  
gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc 5460  
ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg 5520  
agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg 5580  
cggccttttt acggttcctg gccttttgct ggccttttgc tcacatgttc tttcctgcgt 5640  
tatcccctga ttctgtggat aaccgtatta ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc 5700  
gcagccgaac gaccgagcgc agcagagtcag tgagcgagga agcggaagag cgcccaatac 5760  
gcaaaccgcc tctccccgcg cgttggccga ttcattaatg cagctggcac gactagagtc 5820  
ccgctgaggc ggcgtagcag gtcagccgcc ccagcgggtg tcaccaaccg ggggtggaacg 5880  
gcgccggtat cgggtgtgtc cgtggcgctc attccaacct ccgtgtgttt gtgcaggttt 5940  
cgcgtgttgc agtccctcgc accggcaccc gcagcgaggg gctcacgggt gccggtgggt 6000  
cgactagtgc agtgatgggt atggtgatgc tcgagagatc taagcttgga tccgcggccg 6060  
ctacgtagaa ttcccatggc gtgatgggtga tgggtgatggc ccatatgtat atctccttct 6120  
taaagttaaa caaaattatt tctagacgcc gtccacgctg cctcctcacg tgacgtgagg 6180  
tgcaagcccc gacgttccgc gtgccacgcc gtgagccgcc gcgtgccgtc ggctccctca 6240  
gcccggggcg ccgtggggagc ccgcctcgat atgtacaccc gagaagctcc cagcgtcctc 6300  
ctggggccgc atactcgacc accacgcacg cacaccgcac taacgattcg gccggcgctc 6360  
gattcggccg gcgctcgatt cggccggcgc tcgattcggc cggcgctcga ttcggccggc 6420  
gctcgattcg gccgagcaga agagtgaaca accaccgacc acgcttccgc tctgcgcgcc 6480  
gtacccgacc tacctcccgc agctcgaagc agtccccggg agtaccgccc tactcaccgc 6540  
cctgtgctca ccatccaccg acgcaaagcc caacccgagc acacctcttg caccaagggtg 6600  
ccgaccgtgg ctttccgctc gcagggttcc agaagaaatc gaacgatcca gcgcggcaag 6660  
gttcaaaaag caggggttgg tggggaggag gttttggggg gtgtcgccgg gatacctgat 6720  
atggctttgt tttgcgtagt cgaataattt tccatatagc ctcggcgcgt cggactcgaa 6780  
tagttgatgt gggcgggcac agttgcccc tgaaatccgc aacggggggc gtgctgagcg 6840  
atcggcaatg ggcggtatgc gtgttgcttc cgcaccggcc gttcgcgacg aacaacctcc 6900  
aacgagggtca gtaccgatg agccgcgacg acgcattggc aatgcggtac gtcgagcatt 6960  
caccgcacgc gttgctcgga tctatcgtca tcgactgcga tcacgttgac gccgcgatgc 7020

gcgcattcga gcaaccatcc gaccatccgg cgccgaactg ggtcgcacaa tcgccgtccg 7080  
 gccgcgcaca catcgatgg tggctcggcc ccaaccacgt gtgccgcacc gacagcgccc 7140  
 gactgacgcc actgcgtac gccaccgca tcgaaaccgg cctcaagatc agcgtcggcg 7200  
 gcgatttcgc gtatggcggg caactgacca aaaacccgat tcaccccgat tgggagacga 7260  
 tctacggccc ggccaccccg tacacattgc ggcagctggc caccatccac acaccccggc 7320  
 agatgccgcg tcggcccgat cgggccgtgg gcctggggcg caacgtcacc atgttcgacg 7380  
 ccacccggcg atgggcatac ccgcagtggg ggcaacaccg aaacggaacc ggccgcgact 7440  
 gggaccatct cgtcctgcag cactgccacg ccgtcaacac cgagttcacg acaccactgc 7500  
 cgttcaccga agtacgcgcc accgcgcaat ccatctccaa atggatctgg cgcaatttca 7560  
 ccgaagaaca gtaccgagcc cgacaagcgc atctcgggtca aaaaggcggc aaggcaacga 7620  
 cactcgccaa acaagaagcc gtccgaaaca atgcaagaaa gtacgacgaa catacgatgc 7680  
 gagaggcgat tatctgatgg gcggagccaa aaatccggtg cgccgaaaga tgacggcagc 7740  
 agcagcagcc gaaaaattcg gtgcctccac tcgcacaatc caacgcttgt ttgctgagcc 7800  
 gcgtgacgat tacctcggcc gtgcgaaagc tcgccgtgac aaagctgtcg agctgcggaa 7860  
 gcaggggttg aagtaccggg aaatcgccga agcgatggaa ctctcgaccg ggatcgtcgg 7920  
 ccgattactg cacgacgccc gcaggcacgg cgagatttca gcggaggatc tgtcggcgta 7980  
 accaagtcag cgggttgctg ggttcgggcc ggcgctcggc actcggaccg gccggcggat 8040  
 ggtgttctgc ctctggcgca gcgtcagcta ccgccgaagg cctgtcatcg accggcttcg 8100  
 actgaagtat gagcaacgtc acagcctgtg attggatgat ccgctcacgc tcgaccgcta 8160  
 cctgttcagc tgccgcccgc tgggcatgag caacggccaa ctctcgttca a 8211

<210> 93

<211> 8275

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:vector pTip-RT1

<400>-93

gttaacgacc gcgcgggtcc cggacgggga agagcgggga gctttgccag agagcgacga 60

cttcccccttg cgttgggtgat tgccgggtcag ggcagccatc cgccatcgtc gcgtaggggtg 120  
tcacaccccca ggaatcgcgt cactgaacac agcagccggt aggacgacca tgactgagtt 180  
ggacaccatc gcaaattccgt ccgatcccgc ggtgcagcgg atcatcgtatg tcaccaagcc 240  
gtcacgatcc aacataaaga caacgttgat cgaggacgtc gagccccctca tgcacagcat 300  
cgcgggccggg gtggagttca tcgaggtcta cggcagcgac agcagtcctt ttccatctga 360  
gttgctggat ctgtgcgggc ggcagaacat accggtccgc ctcatcgact cctcgatcgt 420  
caaccagttg ttcaaggggg agcgggaaggc caagacattc ggcatcgccc gcgtccctcg 480  
cccggccagg ttcggcgata tcgcgagccg gcgtggggac gtcgtcgttc tcgacgggggt 540  
gaagatcgtc gggaacatcg gcgcgatagt acgcacgtcg ctgcgcgtcg gagcgtcggg 600  
gatcatcctg gtggacagtg acatcaccag catcgccgac cggcgtctcc aaagggccag 660  
ccgaggttac gtctttctccc ttcccgctgt tctctccggt cgcgaggagg ccatcgccctt 720  
cattcgggac agcgggtatgc agctgatgac gctcaaggcg gatggcgaca tttccgtgaa 780  
ggaactcggg gacaatccgg atcggctggc cttgctgttc ggcagcgaaa aggggtgggccc 840  
ttccgacctg ttcgaggagg cgtcttccgc ctcggtttcc atcccatga tgagccagac 900  
cgagtctctc aacgtttccg tttccctcgg aatcgcgctg cacgagagga tcgacaggaa 960  
tctcgcggcc aaccgataag cgcctctgtt cctcggacgc tcggttctct gacctcgatt 1020  
cgtcagtgat gatcacctca cacggcagcg atcaccactg acatatcgag gtcaacggtc 1080  
gtggtccggg cgggcactcc tcgaaggcgc ggccgacgcc cttgaacgac tcgatgactc 1140  
tagagtaacg ggctactccg tttaacggac ccggttctca cgcttttaggc ttgaccccgg 1200  
agcctgcatg gggcattccg ccgtgaaccc ggtggaatgc ccccggcacc cgggctttcc 1260  
agcaaagatc acctggcgcc gatgagtaag gcgtacagaa ccaactccaca ggaggaccgt 1320  
cgagatgaaa tctaacaatg cgtcatcgt catcctcggc accgtcaccc tggatgctgt 1380  
aggcataggc ttggttatgc cggctactgcc gggcctcttg cgggatatcg tccattccga 1440  
cagcatcgcc agtcactatg gcgtgctgct agcgtatat gcgttgatgc aatttctatg 1500  
cgcacccgtt ctggagcac tgtccgaccg ctttggccgc cgcccagtcc tgctcgcttc 1560  
gtacttggga gccactatcg actacgcgat catggcgacc acaccgtcc tgtggattct 1620  
ctacgccgga cgcatcgtgg ccggcatcac cggcgccaca ggtgcggttg ctggcgccta 1680  
tatcgccgac atcaccgatg gggaagatcg ggctcgccac ttcgggctca tgagcgcttg 1740  
tttcggcgtg ggtatggtgg caggccccgt ggccggggga ctgttgggcg ccatctcctt 1800  
gcatgcacca ttccttgagg cggcggtgct caacggcctc aacctactac tgggctgctt 1860



cctaatagcag gagtcgcata agggagagcgc tcgtccgatg cccttgagag ccttcaaccc 1920  
agtcagctcc ttccgggtggg cgcggggcat gactatcgtc gccgcactta tgactgtctt 1980  
ctttatcatg caactcgtag gacaggtgcc ggcagcgcctc tgggtcattt tcggcgagga 2040  
ccgctttcgc tggagcgcga cgatgatcgg cctgtcgcctt gcggtattcg gaatcttgca 2100  
cgccctcgcct caagccttcg tcaactgggtcc cgccaccaa cgtttcggcg agaagcaggc 2160  
cattatcgcc ggcatggcgg ccgacgcgct gggctacgtc ttgctggcgt tcgcgacgcg 2220  
aggctggatg gccttcccca ttatgattct tctcgccttc gccggcatcg ggatgccgcg 2280  
gttgaggcc atgctgtcca ggcaggtaga tgacgacct cagggacagc ttcaaggatc 2340  
gctcgcggct cttaccagcc taacttcgat cattggaccg ctgatcgtca cggcgattta 2400  
tgccgcctcg gcgagcacat ggaacgggtt ggcatggatt gtaggcgcgc ccctatacct 2460  
tgtctgctc cccgcgttgc gtcgcgggtgc atggagccgg gccacctga cctgaatgga 2520  
agccggcggc acctcgctaa cggattcacc actccaagaa ttggagccaa tcaattcttg 2580  
cggagaactg tgaatgcgca aaccaacct tggcagaaca tatccatcg gtccgccatc 2640  
tccagcagcc gcacgcggcg catctcgggc agcgttgggt cctggccacg ggtgcgcatg 2700  
atcgtgctcc tgtcgttgag gactagaatt gatctcctcg accgccaatt gggcatctga 2760  
gaatcatctg cgtttctcgc acgcaacgta cttgcaacgt tgcaactcct agtggttgga 2820  
atcacacccc accgggggggt gggattgcag tcaccgattt ggtgggtgcg ccaggaaga 2880  
tcacgtttac ataggagctt gcaatgagct actccgtggg acaggtggcc ggcttcgccg 2940  
gagtgcggt gcgcacgctg caccactacg acgacatcgg cctgctcgta ccgagcgagc 3000  
gcagccacgc gggccaccgg cgctacagcg acgccgacct cgaccggctg cagcagatcc 3060  
tgttctaccg ggagctgggc ttcccgcctc acgaggtcgc cgccctgctc gacgaccgg 3120  
ccgcggaccc gcgcgcgcac ctgcgcgcc agcacgagct gctgtccgcc cggatcggga 3180  
aactgcagaa gatggcggcg gccgtggagc aggcgatgga ggcacgcagc atgggaatca 3240  
acctacccc ggaggagaag ttcgaggtct tcggcgactt cgaccccgac cagtacagg 3300  
aggaggtccg ggaacgctgg gggaacaccg acgcctaccg ccagtccaag gagaagaccg 3360  
cctcgtacac caaggaggac tggcagcgca tccaggacga ggccgacgag ctcaccggc 3420  
gcttcgtcgc cctgatggac gcgggtgagc ccgccgactc cgagggggcg atggacgccg 3480  
ccgaggacca ccggcagggc atgcccgc accactacga ctgcgggtac gagatgcaca 3540  
cctgcctggg cgagatgtac gtgtccgacg aacgtttcac gcgaaacatc gacgcccca 3600  
agccgggcct cgccgcctac atgcgcgacg cgatcctcgc caacgccgctc cggcacaccc 3660

cctgagcggg ggtcgtggcc cgggtctccc gcccggtctc accccacggc tcactcccgg 3720  
gccacgacca ccgccgtccc gtacgcgcac acctcggtgc ccacgtccgc cgcctccgtc 3780  
acgtcgaaac ggaagatccc cgggtaccga gctcgtcagg tggcactttt cggggaaatg 3840  
tgcgcggaac ccctatttgt ttatTTTTtct aaatacatte aaatatgtat ccgctcatga 3900  
gacaataacc ctgataaatg cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac 3960  
atttccgtgt cgcctttatt ccctTTTTtg cggcattttg ccttcctggt tttgctcacc 4020  
cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt ggggtgcacga gtgggttaca 4080  
tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc 4140  
caatgatgag cactttttaa gttctgctat gtggcgcggt attatcccgt attgacgccg 4200  
ggcaagagca actcggtcgc cgcatacact attctcagaa tgacttggtt gagtactcac 4260  
cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca 4320  
taaccatgag tgataaacact gcggccaact tacttctgac aacgatcggg ggaccgaagg 4380  
agctaaccgc ttttttgcac aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cgttggggaa 4440  
cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg 4500  
caacaacgtt gcgcaaacta ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat 4560  
taatagactg gatggaggcg gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gcccttcagg 4620  
ctggctggtt tattgctgat aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg 4680  
cagcactggg gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc 4740  
aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc 4800  
attggtaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt 4860  
tttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt 4920  
aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag acccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt 4980  
gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaacca ccgctaccag 5040  
cgggtggtttg tttgccggat caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca 5100  
gcagagcgca gataccaaat actgttcttc tagtgtagcc gtagttaggc caccacttca 5160  
agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgctaatt cctgttacca gtggctgctg 5220  
ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt tggactcaag acgatagtta ccggataagg 5280  
cgcagcggtc gggctgaacg ggggggttcgt gcacacagcc cagcttgag cgaacgacct 5340  
acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaaag cgccacgctt cccgaaggga 5400  
gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca gggctcggaac aggagagcgc acgagggagc 5460

ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg 5520  
agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg 5580  
cggccttttt acggttctctg gccttttctg ggccttttgc tcacatgttc tttcctgcgt 5640  
tatcccctga ttctgtggat aaccgtatta ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc 5700  
gcagccgaac gaccgagcgc agcgagtcag tgagcgagga agcggaagag cgcccaatac 5760  
gcaaaccgcc tctccccgcg cgttggccga ttcattaatg cagctggcac gactagagtc 5820  
ccgctgaggc ggcgtagcag gtcagccgcc ccagcgggtg tcaccaaccg ggggtggaacg 5880  
gcgcgcgtat cgggtgtgtc cgtggcgctc attccaacct ccgtgtgttt gtgcaggttt 5940  
cgcggtgttc agtccctcgc accggcaccg gcagcgaggg gctcacgggt gccggtgggt 6000  
cgactagttc agtgatgggtg atggatgatgc tcgagagatc taagcttgga tccgcggccg 6060  
ctacgtagaa ttcccatatg gtgatgggtga tgggtggcca tggatatct ctttcttaaa 6120  
gttaaacaaa attatttcta gacgccgtcc acgtgcctc ctcacgtgac gtgaggtgca 6180  
agcccgagc ttccgcgtgc cagcccggtga gccgccgcgt gccgtcggct ccctcagccc 6240  
gggcggccgt gggagcccg ctcgatatgt acaagcatgg ggactcgccg cggactagcg 6300  
gcttcccgac acgccgtact gaccagcaga tcagcgataa acgtgtttc tgctggttaa 6360  
gtggataaaa accaaataat cgatgaacct cgaagtggag tatccgagct gaactagctg 6420  
gatttactcc gaaaatacga gcggcgacga aggggtgttg accaccctgc cgccgccttc 6480  
gaggctccta cttgactagg accccgctcg ttatgaccag cgtaagtgtc gaacaccttt 6540  
ccggcaaaga ccggccccct gtcctcgtgt cgtccgataa gcgcggcatc cggcacgaac 6600  
ttcgaccaa acttcaacaa atcaccacgt cagaaacttt taatgcgtgc ggccggccga 6660  
tttccggcgt gaacgggtgtg accatcgtca acggtcccaa aggttccgga tttggaggcc 6720  
ttcgctcctg cggaaagggc tggatctgcc cctgctgtgc gggaaaagtc ggcgcacatc 6780  
gagcagacga aatttctcaa gttgttgctc atcaactcgg gactggatct gttgcgatgg 6840  
tgaccatgac catgcgccat accgctgggc agcgtttgca tgatttgttg actggacttt 6900  
cggcagcctg gaaagctgcg accaatggcc gccgatggcg taccgaacgt gaaatgtacg 6960  
gctgcgacgg atacgtacga gctgttgaaa tcactcacgg aaaaaacggt tggcacgttc 7020  
acgtccacgc tctactcatg ttcagcgggtg acgtgagtga gaacatcctc gaatccttct 7080  
cggatgcgat gttcgatcgg tggacctcca aactcgtgtc tctgggattt gctgcgccac 7140  
tacgtaattc aggtggactc gacgtaagaa agattgggtg agaagctgac caagttctcg 7200  
ctgcatacct gacgaaaatt gcatccgggg tcggcatgga agtcggcagt ggcgacggaa 7260

aaagtgggtcg gcacggcaac cgtgcacctt gggaaatcgc cgttgatgca gtcggaggag 7320  
 atccacaagc gttggaactc tggcgcgagt ttgagttcgg ttcgatggga cgccgagcaa 7380  
 tcgcatggtc tcgtggactg cgcgccccgag ctggtcttgg cgtagaactc acggatgctc 7440  
 agattgtcga acaggaagaa tctgccccgg tcatggttgc gatcattccg gctcggtcct 7500  
 ggatgatgat tcggaactgt gcgccttacg ttttcggaga gatccttgga ctctggaag 7560  
 cgggcgcgac ctgggaaaac cttcgtgacc acttgatta tcgattgcct gcagcggatg 7620  
 tgcggcctcc gataatatcg attcgtaagt gaaatgtctt ggtgtgcaac aactttcact 7680  
 cgtatgaacc acacttgagg gcatcccccc gatacttgcc gctttgaagc tgggtgtctc 7740  
 tctgtcaggg ctgcgatagc accgcgtagc ggcttggcct tgacagagag acggcctgtt 7800  
 tcatggttgg tctcgggggg ctgaccgggc agatagaaaa aggccggccg atttggctgc 7860  
 cgactatttt tgcaggtaaa cccatctcat gagcatcaat gaacgtcccg ttggtatcgc 7920  
 agcgaatgca gcttcggtag acgtcgatgg cgttgtgatg ggtgtgtatc tctcgcttta 7980  
 tgggcaagaa atcacgctag atcgagatga tgcgttccta ctctcgatc gacttcagga 8040  
 cgcgttgca cctcaagcca actaagaacc ctccagatgg tctaaacgag gcgcaaactc 8100  
 gctcctgggc ctgcgggcgg agcaccgaag cgcgagcgaa gcggagcgcg taggtggggg 8160  
 agcctgcggg cagcggcggc ggagccgccg ccttggtaat aggtgatcat cggggccata 8220  
 gcaggtcaga ggatgttttt acgatgactc atgctcacca cgccaagtac tgatg 8275

<210> 94

<211> 8279

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:vector pTip-RT2

<400> 94

gttaacgacc gcgcgggtcc cggacgggga agagcgggga gctttgccag agagcgacga 60  
 cttccccttg cgttggatgat tgccggtcag ggcagccatc cgccatcgtc gcgtaggggtg 120  
 tcacacccca ggaatcgcgt cactgaacac agcagccggt aggacgacca tgactgagtt 180

ggacaccatc gcaaatccgt ccgatcccgc ggtgcagcgg atcatcgatg tcaccaagcc 240  
gtcacgatcc aacataaaga caacgttgat cgaggacgtc gagcccctca tgcacagcat 300  
cgcggccggg gtggagttca tcgaggtcta cggcagcgac agcagtcctt ttccatctga 360  
gttgctggat ctgtgcgggc ggcagaacat accggtccgc ctcatcgact cctcgatcgt 420  
caaccagttg ttcaaggggg agcgggaaggc caagacattc ggcatcgccc gcgtccctcg 480  
cccggccagg ttccggcgata tcgcgagccg gcgtggggac gtcgtcgttc tcgacgggggt 540  
gaagatcgtc gggaacatcg gcgcgatagt acgcacgtcg ctgcgcgtcg gagcgtcggg 600  
gatcatcctg gtggacagtg acatcaccag catcgcgac cggcgtctcc aaagggccag 660  
ccgaggttac gtcttctccc ttcccgctgt tctctccggt cgcgaggagg ccatcgctt 720  
cattcgggac agcgggtatgc agctgatgac gctcaaggcg gatggcgaca tttccgtgaa 780  
ggaactcggg gacaatccgg atcggctggc cttgctgttc ggcagcgaaa aggggtgggcc 840  
ttccgacctg ttccgaggagg cgtcttccgc ctcggtttcc atcccatga tgagccagac 900  
cgagtctctc aacgtttccg tttccctcgg aatcgcgctg cacgagagga tcgacaggaa 960  
tctcgcggcc aaccgataag cgctctgtt cctcggaacg tcggttctc gacctcgatt 1020  
cgtcagtgat gatcacctca cacggcagcg atcaccactg acatatcgag gtcaacggtc 1080  
gtggtccggg cgggcactcc tcgaaggcgc ggccgacgcc cttgaacgac tcgatgactc 1140  
tagagtaacg ggctactccg tttaacggac cccgttctca cgcttttagg ttgaccccg 1200  
agcctgcatg gggcattccg ccgtgaacct ggtggaatgc ccccggcacc cgggctttcc 1260  
agcaaagatc acctggcgcc gatgagtaag gcgtacagaa ccaactccaca ggaggaccgt 1320  
cgagatgaaa tctaacaatg cgctcatcgt catcctcggc accgtcaccc tggatgctgt 1380  
aggcataggc ttggttatgc cggctactgcc gggcctcttg cgggatatcg tccattccga 1440  
cagcatcgcc agtcactatg gcgtgctgct agcgtatat gcgttgatgc aatttctatg 1500  
cgcacccgtt ctccggagcac tgtccgaccg ctttggccgc cgcccagtc tgctcgcttc 1560  
gctacttgga gccactatcg actacgcgat catggcgacc acaccgtcc tgtggattct 1620  
ctacgccgga cgcatcgtgg ccggcatcac cggcgccaca ggtgcggttg ctggcgcta 1680  
tatcgccgac atcaccgatg gggaagatcg ggctcgccac ttcgggctca tgagcgcttg 1740  
tttcggcgtg ggtatggtgg caggccccgt ggccggggga ctgttgggcg ccatctcctt 1800  
gcatgcacca ttcttgcgg cggcggtgct caacggcctc aacctactac tgggctgctt 1860  
cctaatagcag gagtcgcata agggagagcg tcgtccgatg cccttgagag cttcaaccc 1920  
agtcagctcc ttccggtggg cgcggggcat gactatcgtc gccgcaacta tgactgtctt 1980

ctttatcatg caactcgtag gacaggtgcc ggcagcgctc tgggtcattt tcggcgagga 2040  
ccgctttcgc tggagcgcgga cgatgatcgg cctgtcgctt gcggtattcg gaatccttgca 2100  
cgccctcgct caagccttcg tcaactgggtcc cgccaccaa cgtttcggcg agaagcaggc 2160  
cattatcgcc ggcatggcgg ccgacgcgct gggctacgtc ttgctggcgt tcgcgacgcg 2220  
aggctggatg gccttcccca ttatgattct tctcgcttcc ggcggcatcg ggatgcccgc 2280  
gttgcaggcc atgctgtcca ggcaggtaga tgacgaccat cagggacagc ttcaaggatc 2340  
gctcgcggct cttaccagcc taacttcgat cattggaccg ctgatcgtca cggcgattta 2400  
tgccgcctcg gcgagcacat ggaacgggtt ggcatggatt gtaggcgcgc ccctatacct 2460  
tgtctgcctc ccgcggttgc gtcgcgggtc atggagccgg gccacctga cctgaatgga 2520  
agccggcggc acctcgctaa cggattcacc actccaagaa ttggagccaa tcaattcttg 2580  
cggagaactg tgaatgcgca aaccaaccct tggcagaaca tatccatcgc gtccgccatc 2640  
tccagcagcc gcacgcggcg catctcgggc agcgttgggt cctggccacg ggtgcgcatg 2700  
atcgtgctcc tgtcgttgag gactagaatt gatctcctcg accgccaatt gggcatctga 2760  
gaatcatctg cgtttctcgc acgcaacgta cttgcaacgt tgcaactcct agtgttgtga 2820  
atcacacccc accgggggggt gggattgcag tcaccgattt ggtgggtgcg ccaggaaga 2880  
tcacgtttac ataggagctt gcaatgagct actccgtggg acaggtggcc ggcttcgccg 2940  
gagtgcgggt gcgcacgctg caccactacg acgacatcgg cctgctcgta ccgagcgagc 3000  
gcagccacgc gggccaccgg cgctacagcg acgccgacct cgaccggctg cagcagatcc 3060  
tgttctaccg ggagctgggc ttcccgctcg acgaggtcgc cgccctgctc gacgaccggg 3120  
ccgcggaccc gcgcgcgcac ctgcgcgcgc agcacgagct gctgtccgcc cggatcggga 3180  
aactgcagaa gatggcgggc gccgtggagc aggcgatgga ggcacgcagc atgggaatca 3240  
acctacccc ggaggagaag ttcgaggtct tcggcgactt cgaccccgac cagtacgagg 3300  
aggaggtccg ggaacgctgg gggaacaccg acgcctaccg ccagtccaag gagaagaccg 3360  
cctcgtacac caaggaggac tggcagcgca tccaggacga ggccgacgag ctcaccgggc 3420  
gttctcgc cctgatggac gcgggtgagc ccgccgactc cgagggggcg atggacgccg 3480  
ccgaggacca ccggcagggc atcgcccga accactacga ctgcgggtac gagatgcaca 3540  
cctgcctggg cgagatgtac gtgtccgacg aacgtttcac gcgaaacatc gacgccgcca 3600  
agccgggcct cgccgcctac atgcgcgacg cgatcctcgc caacgccgtc cggcacaccc 3660  
cctgagcggg ggtcgtggcc cgggtctccc gcccggtctc accccacggc tcaactcccgg 3720  
gccacgacca ccgccgtccc gtacgcgcac acctcggtgc ccacgtccgc cgcctccgtc 3780

acgtcgaaac ggaagatccc cgggtaccga gctcgtcagg tggcactttt cggggaaatg 3840  
tgcgcggaac ccctatttgt ttatttttct aaatacatte aaatatgtat ccgctcatga 3900  
gacaataacc ctgataaatg cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac 3960  
atttccgtgt cgcccttatt cccttttttg cggcattttg ccttcctggt tttgctcacc 4020  
cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt ggggtgcacga gtgggttaca 4080  
tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc 4140  
caatgatgag cactttttaa gttctgctat gtggcgcggt attatcccgt attgacgccg 4200  
ggcaagagca actcggtcgc cgcatacact attctcagaa tgacttggtt gagtactcac 4260  
cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca 4320  
taaccatgag tgataacact gcggccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg 4380  
agctaaccgc ttttttgcac aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaac 4440  
cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg 4500  
caacaacgtt gcgcaaacta ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat 4560  
taatagactg gatggaggcg gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gcccttcg 4620  
ctggctggtt tattgctgat aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg 4680  
cagcactggg gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc 4740  
aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc 4800  
attggtaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt 4860  
tttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt 4920  
aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt 4980  
gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaacca ccgctaccag 5040  
cggtggtttg tttgccgat caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca 5100  
gcagagcgca gataccaaat actgttcttc tagtgtagcc gtagttaggc caccacttca 5160  
agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgctaat cctgttacca gtggctgctg 5220  
ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt tggactcaag acgatagtta ccggataagg 5280  
cgcagcggtc gggctgaacg ggggggttcgt gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct 5340  
acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga 5400  
gaaaggcgga caggatccg gtaagcggca gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc 5460  
ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg 5520  
agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg 5580

cggccttttt acggttcctg gccttttgct ggcccttttg tcacatgttc tttcctgcgt 5640  
tatcccctga ttctgtggat aaccgtatta ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc 5700  
gcagccgaac gaccgagcgc agcgagtcag tgagcgagga agcggaagag cgcccaatac 5760  
gcaaaccgcc tctccccgcg cgttggccga ttcattaatg cagctggcac gactagagtc 5820  
ccgctgaggc ggcgtagcag gtcagccgcc ccagcgggtg tcaccaaccg ggggtggaacg 5880  
gcgccggtat cgggtgtgtc cgtggcgctc attccaacct ccgtgtgttt gtgcaggttt 5940  
cgcggtttgc agtcctcgc accggcaccc gcagcgaggg gctcacgggt gccgggtgggt 6000  
cgactagtgc agtgatgggt atggtgatgc tcgagagatc taagcttga tccgcggccg 6060  
ctacgtagaa ttcccatggc gtgatgggtg tggatgatgc ccatatgtat atctccttct 6120  
taaagttaaa caaaattatt tctagacgcc gtccacgctg cctcctcacg tgacgtgagg 6180  
tgcaagcccg gacgttccgc gtgccacgcc gtgagccgcc gcgtgccgtc ggctccctca 6240  
gcccggggcg ccgtgggagc ccgcctcgat atgtacaagc atggggactc gccgcggact 6300  
agcggcttcc cgacacgccg tactgaccag cagatcagcg ataaacgctg tttctgctgg 6360  
ttaagtggat aaaaaccaa taatcgatga acctcgaagt ggagtatccg agctgaacta 6420  
gctggattta ctccgaaaat acgagcggcg acgaagggtg ttggaccacc ctgccgccgc 6480  
cttcgaggct cctacttgac taggaccccg ctcgttatga ccagcgtaag tgctgaacac 6540  
ctttccggca aagaccggcc ccctgtcctc gtgtcgtccg ataagcgcg catccggcac 6600  
gaacttcgac ccaaacttca acaaatcacc acgtcagaaa cttttaatgc gtgcggccgg 6660  
ccgatttccg gcgtgaacgg tgtgaccatc gtcaacggtc ccaaagggtc cggatttggga 6720  
ggccttcgct cctgcggaaa gggctggatc tgcccctgct gtgcgggaaa agtcggcgca 6780  
catcgagcag acgaaatttc tcaagttggt gtcacatcaac tcgggactgg atctgttgcg 6840  
atggtgacca tgaccatgcg ccataccgct gggcagcggt tgcattgatt gtggactgga 6900  
ctttcggcag cctggaaagc tgcgaccaat ggccgccgat ggcgtaccga acgtgaaatg 6960  
tacggctgcg acggatacgt acgagctggt gaaatcactc acggaaaaaa cggttggcac 7020  
gttcacgtcc acgctctact catgttcagc ggtgacgtga gtgagaacat cctcgaatcc 7080  
ttctcggatg cgatgttcga tcggtggacc tccaaactcg tgtctctggg atttgcgtcg 7140  
ccactacgta attcaggtgg actcgacgta agaaagattg gtggagaagc tgaccaagtt 7200  
ctcgctgcat acctgacgaa aattgcatcc ggggtcggca tggaagtcgg cagtggcgac 7260  
ggaaaaagtg gtcggcacgg caaccgtgca ccttgggaaa tcgccgttga tgcagtcgga 7320  
ggagatccac aagcgttggga actctggcgc gagtttgagt tcggttcgat gggacgccga 7380



gcaatcgcat ggtctcgtgg actgcgcgcc cgagctggtc ttggcgtaga actcacggat 7440  
gctcagattg tcgaacagga agaatctgcc ccggtcatgg ttgcgatcat tccggctcgg 7500  
tcctggatga tgattcggaa ctgtgcgcct tacgttttcg gagagatcct tggactcgtg 7560  
gaagcgggcg cgacctggga aaaccttcgt gaccacttgc attatcgatt gcctgcagcg 7620  
gatgtgcggc ctccgataat atcgattcgt aagtgaatg tcttggtgtg caacaacttt 7680  
cactcgtatg aaccacactt gagggcatcc ccccgatact tgccgctttg aagctgggtg 7740  
tctctctgtc agggctgcga tagcaccgcg tagcggcttg gccttgacag agagacggcc 7800  
tgtttcatgg ttggtctcgg ggggctgacc gggcagatag aaaaaggccg gccgatttgg 7860  
ctgccgacta tttttgcagg taaaccctac tcatgagcat caatgaacgt cccgttggtg 7920  
tcgcagcgaa tgcagcttcg gtagacgtcg atggcgttgt gatgggtgtg tatctctcgc 7980  
tttatgggca agaaatcacg ctagatcgag atgatgcgtt cctactcctc gatcgacttc 8040  
aggacgcgtt gcgacctcaa gccaaactaag aacctccag atggtctaaa cgaggcgcaa 8100  
actcgtcctt gggcctgcgg gcggagcacc gaagcgcgag cgaagcggag cgcgtaggtg 8160  
ggggagcctg cgggcagcgg cgggcgagcc gccgccttgg taataggtga tcatcggggc 8220  
catagcaggt cagaggatgt ttttacgatg actcatgctc accacgcaa gtactgatg 8279

<210> 95

<211> 8384

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:vector pTip-QC1

<400> 95

gagctcgacc gcgcgggtcc cggacgggga agagcgggga gctttgccag agagcgacga 60  
cttccccttg cgttggtgat tgccggtcag ggcagccatc cgccatcgtc gcgtaggggtg 120  
tcacacccca ggaatcgcgt cactgaacac agcagccggt aggacgacca tgactgagtt 180  
ggacaccatc gcaaattccgt ccgatcccgc ggtgcagcgg atcatcgatg tcaccaagcc 240  
gtcacgatcc aacataaaga caacgttgat cgaggacgtc gagcccctca tgcacagcat 300

cgcgccggg gtggagttca tcgaggtcta cggcagcgac agcagtcctt ttccatctga 360  
gttgctggat ctgtgcgggc ggcagaacat accggtccgc ctcatcgaat cctcgatcgt 420  
caaccagttg ttcaaggggg agcgggaaggc caagacattc ggcatcgccc gcgtccctcg 480  
cccggccagg ttcggcgata tcgcgagccg gcgtggggac gtcgtcgttc tcgacgggggt 540  
gaagatcgtc gggaacatcg gcgcgatagt acgcacgtcg ctgcgcgtcg gagcgtcggg 600  
gatcatcctg gtggacagtg acatcaccag catcgcggaac cggcgtctcc aaagggccag 660  
ccgaggttac gtcttctccc ttcccgtcgt tctctccggt cgcgaggagg ccatcgcctt 720  
cattcgggac agcggtatgc agctgatgac gctcaaggcg gatggcgaca tttccgtgaa 780  
ggaactcggg gacaatccgg atcggctggc cttgctgttc ggcagcgaaa aggggtgggcc 840  
ttccgacctg ttcgaggagg cgtcttccgc ctcggtttcc atcccatga tgagccagac 900  
cgagtctctc aacgtttccg tttccctcgg aatcgcgctg cacgagagga tcgacaggaa 960  
tctcgcggcc aaccgataag cgcctctgtt cctcggacgc tcggttcctc gacctcgatt 1020  
cgtcagtgat gatcacctca cacggcagcg atcaccactg acatatcgag gtcaacggtc 1080  
gtggtccggg cgggcactcc tcgaaggcgc ggccgacgcc cttgaacgac tcgatgactc 1140  
tagacgcata cgaaacctcc acccactca cctagtcgga catccgtacc ttggaaaccg 1200  
acctgtattg gcatttcagt tggacatcga ccagtggcgt tgctaggttc aagaccatgt 1260  
ccagcccgaa ggcgtccaga ctctagccac cggaggtagt ccggtggcca catcccgtcg 1320  
cgcccgaaacg tcacgctctt gtgtggcctt cccttgttgt ttgcgatcag tggcacacct 1380  
ctaccgtctg aatttcagat ctggcctcgg ctgcgcacat ctgcgactgt gacgtgtca 1440  
ggtcacccgc ttcgcggcta ccagttcctt tcatcgaatc gagcttcggg tgccgccgcg 1500  
cagcctccct gaccatcctc agattttatg gagtctcgca gtgcctttcg ctatctacgt 1560  
cctcgggctt gctgtcttcg ccagggcac atccgagttc atgttgctcg gactcatacc 1620  
ggacatggcc cgtgacctcg gggtttcggt cccgccgcc ggactcctca cctccgcctt 1680  
cgcggtcggg atgatcatcg gcgctccgtt gatggctatc gccagcatgc ggtggccccg 1740  
gcgacgcgcc cttctgacat tcctcatcac gttcatgctg gtccacgtca tcggcgcgct 1800  
caccagcagc ttcgaggtct tgctggtcac acgcatcgtg ggagccctcg ccaatgccgg 1860  
attcttgga gtggccctgg gggcgcgat ggcgatggtg cccgccgaca tgaaagggcg 1920  
cgccacgtcc gtcctcctcg gcggtgtcac gatcgcatgt gtagccggtg ttcccggggg 1980  
cgccttcctg ggtgaaatgt ggggctggcg tgcagcgttc tgggctgtcg tcgtcatctc 2040  
cgccccctgca gtggtggcga ttatgttcgc cccccggcc gagccgcttg cagagtccac 2100

accgaatgcc aagcgtgaac tgtcctcact gcgctcacgc aagctccagc tcatgcttgt 2160  
cctcggggcg ctgatcaacg gcgcaacgtt ctgttcgttc acgtacatgg cgcccacgct 2220  
caccgacatc tccggtttcg actcccgttg gattccgttg ctgctggggc tgttcgggct 2280  
cggatcgttc atcgggtgtca gcgtcggagg caggctcgcc gacacccggc cgttccaact 2340  
gctcgtgtc gggtcgcag cactgttgac gggatggatc gtcttcgctc tcacggcatc 2400  
ccaccccgcg gtgacattgg tgatgctgtt cgtgcagggc gctttgtcct tcgcggtcgg 2460  
ctcgactttg atctcccagg tgctctacgc cgccgacgcg gcaccgacct tgggtggatc 2520  
gttcgcgacg gccgcgttca acgtcgggtc tgcaactggga ccggcgctcg gcgggttggc 2580  
gatcggcatg ggtctgagct accgcgcccc gctctggacg agcgccgcg tggtgacact 2640  
cgcgatcgtc atcgggcgag ccacctgtc tctgtggcgg cgaccagcgt ctgtccacga 2700  
atctgtcccc gcctgaccag aaaccaggat ctgtgagtgt ggtgactgat ctgtgcacgc 2760  
tcagcagtca ccgcgcgtc gcgtcgtacc gagggccagc gccaacagggt gtgtggagct 2820  
ctgcccctgc ctctttcacg cgaaactcact gttcagtgcg gcgatacgtg ctcggtgagt 2880  
tccactacag cgaccatgac tagaattgat ctctcgacc gccaatggg catctgagaa 2940  
tcatctgcgt ttctcgacg caacgtactt gcaacgttgc aactcctagt gttgtgaatc 3000  
acacccacc ggggggtggg attgcagtca ccgatttggg ggggtgcgcc aggaagatca 3060  
cgtttacata ggagcttgca atgagctact ccgtgggaca ggtggccggc ttccgccggag 3120  
tgacggtgcg cacgctgcac cactacgacg acatcggcct gctcgtaccg agcgagcgca 3180  
gccacgcggg ccaccggcgc tacagcgacg ccgacctga ccggctgcag cagatcctgt 3240  
tctaccggga gctgggcttc ccgctcgacg aggtcgccgc cctgctcgac gacccggccg 3300  
cggacccgcg cgcgcacctg cgccgccagc acgagctgct gtccgcccgg atcgggaaac 3360  
tgcagaagat ggcggcggcc gtggagcagg cgatggaggc acgcagcatg ggaatcaacc 3420  
tcaccccgga ggagaagttc gaggtcttcg gcgacttcga ccccgaccag tacgaggagg 3480  
aggtccggga acgctggggg aacaccgacg cctaccgcca gtccaaggag aagaccgcct 3540  
cgtaacacaa ggaggactgg cagcgcaccc aggacgaggc cgacgagctc acccggcgct 3600  
tcgtcgccct gatggacgcg ggtgagcccg ccgactccga gggggcgatg gacgccgccc 3660  
aggaccaccg gcagggcacg gcccgcaacc actacgactg cgggtacgag atgcacacct 3720  
gcctgggcga gatgtacgtg tccgacgaac gtttcacgcg aaacatcgac gccgccaagc 3780  
cgggcctcgc cgcctacatg cgcgacgca tcctcgccaa cgccgtccgg cacacccct 3840  
gagcgggtgt cgtggcccggt gtctcccgcc cggctctacc ccacggctca ctcccgggcc 3900

acgaccaccg ccgtcccgta cgcgcacacc tcggtgcca cgtccgccgc ctccgtcacg 3960  
tcgaaacgga agatccccgg gtaccgagct cgtcagggtg cacttttcgg ggaaatgtgc 4020  
gcggaacccc tatttgttta tttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg ctcatgagac 4080  
aataaccctg ataaatgctt caataatatt gaaaaaggaa gagtatgagt attcaacatt 4140  
tccgtgtcgc ccttattccc ttttttgccg cattttgcct tcctgttttt gctcaccag 4200  
aaacgctggg gaaagtaaaa gatgctgaag atcagttggg tgcacgagt gggtacatcg 4260  
aactggatct caacagcggg aagatccttg agagttttcg cccgaagaa cgttttccaa 4320  
tgatgagcac ttttaaagtt ctgctatgtg gcgcggtatt atcccgtatt gacgccgggc 4380  
aagagcaact cggtcgccgc atacactatt ctcaaatga cttggttgag tactcaccag 4440  
tcacagaaaa gcatcttacg gatggcatga cagtaagaga attatgcagt gctgccataa 4500  
ccatgagtga taacactgcg gccaaacttac ttctgacaac gatcggagga ccgaaggagc 4560  
taaccgcttt ttgacacaac atgggggatc atgtaactcg ccttgatcgt tgggaaccgg 4620  
agctgaatga agccatacca aacgacgagc gtgacaccac gatgcctgta gcaatggcaa 4680  
caacgttgcg caaactatta actggcgaac tacttactct agcttcccgg caacaattaa 4740  
tagactggat ggaggcggat aaagttgcag gaccacttct gcgctcggcc cttccggctg 4800  
gctggtttat tgctgataaa tctggagccg gtgagcgtgg gtctcgcggt atcattgcag 4860  
cactggggcc agatggtaag ccctcccgta tcgtagtatt ctacacgacg gggagtcagg 4920  
caactatgga tgaacgaaat agacagatcg ctgagatagg tgcctcactg attaagcatt 4980  
ggtaactgtc agaccaagtt tactcatata tacttttagat tgatttaaaa cttcattttt 5040  
aatttaaaag gatctaggtg aagatccttt ttgataatct catgaccaa atcccttaac 5100  
gtgagttttc gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag 5160  
atcctttttt tctgcgcgta atctgtctgt tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg 5220  
tggtttgttt gccggatcaa gagctaccaa ctctttttcc gaaggttaact ggcttcagca 5280  
gagcgcagat accaaatact gttcttctag tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga 5340  
actctgtagc accgcctaca tacctcgctc tgctaatact gttaccagt gctgctgcca 5400  
gtggcgataa gtctgtcttt accgggttg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc 5460  
agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga acgacctaca 5520  
ccgaactgag atacctacag cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc gaaggagaaa 5580  
aggcggacag gtatccggtg agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc 5640  
cagggggaaa cgcctggtat ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc 5700

gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg 5760  
ccttttttacg gttcctggcc ttttgctggc cttttgctca catgttcttt cctgcgttat 5820  
cccctgattc tgttgataac cgtattaccg cctttgagtg agctgatacc gctcgccgca 5880  
gccgaacgac cgagcgcagc gagtcagtga gcgaggaagc ggaagagcgc ccaatacgca 5940  
aaccgcctct ccccgcgcggt tggccgattc attaatgcag ctggcacgac tagagtcccg 6000  
ctgaggcggc gtagcaggtc agccgccccca gcggtgggtca ccaaccgggg tggaacggcg 6060  
ccggtatcgg gtgtgtccgt ggcgctcatt ccaacctccg tgtgtttgtg caggtttcgc 6120  
gtgttgagtc ccctcgcacc ggcacccgca gcgaggggct cacgggtgcc ggtgggtcga 6180  
ctagttcagt gatggtgatg gtgatgctcg agagatctaa gcttgatcc gcggccgcta 6240  
cgtagaattc ccatatgggtg atggtgatgg tggcccatgg tatatctcct tcttaaagtt 6300  
aaacaaaatt atttctagac gccgtccacg ctgcctcctc acgtgacgtg aggtgcaagc 6360  
ccggacgttc cgcgtgccac gccgtgagcc gccgcgtgcc gtcggctccc tcagcccggg 6420  
cggccgtggg agcccgccctc gatatgtaca cccgagaagc tcccagcgtc ctctggggcc 6480  
gcgatactcg accaccacgc acgcacaccg cactaacgat tcggccggcg ctcgattcgg 6540  
ccggcgctcg attcggccgg cgctcgattc ggccggcgct cgattcggcc ggcgctcgat 6600  
tcggccgagc agaagagtga acaaccaccg accacgcttc cgctctgcgc gccgtaccgg 6660  
acctacctcc cgcagctcga agcagctccc gggagtaccg ccgtactcac ccgcctgtgc 6720  
tcaccatcca ccgacgcaaa gcccaaccgg agcacacctc ttgcaccaag gtgccgaccg 6780  
tggttttccg ctcgcagggt tccagaagaa atcgaacgat ccagcgcggc aaggttcaaa 6840  
aagcaggggt tgggtggggag gaggttttgg ggggtgtcgc cgggatacct gatatggctt 6900  
tgttttgcgt agtcgaataa ttttccatat agcctcggcg cgtcggactc gaatagttga 6960  
tgtgggcggg cacagttgcc ccatgaaatc cgcaacgggg ggcggtgctga gcgatcggca 7020  
atgggcggat gcggtgttgc ttccgcaccg gccgttcgcg acgaacaacc tccaacgagg 7080  
tcagtaccgg atgagccgcg acgacgcatt ggcaatgcgg tacgtcgagc attcaccgca 7140  
cgcgttgctc ggatctatcg tcatcgactg cgatcacgtt gacgcgcga tgccgcgatt 7200  
cgagcaacca tccgaccatc cggcgccgaa ctgggtcgca caatcgccgt ccggccgcgc 7260  
acacatcgga tgggtggctcg gcccaccca cgtgtgccgc accgacagcg cccgactgac 7320  
gccactgcgc tacgcccacc gcacgaaac cggcctcaag atcagcgtcg gcggcgattt 7380  
cgcgatatggc gggcaactga ccaaaaaccc gattcaccac gattgggaga cgatctacgg 7440  
cccggccacc ccgtacacat tgccgcagct ggccaccatc cacacacccc ggcagatgcc 7500

gcgtcggccc gatcgggccc tgggcctggg ccgcaacgtc accatgttcg acgccacc'cg 7560  
 gcgatgggca taccgcagc ggtggcaaca ccgaaacgga accggccgcg actgggacca 7620  
 tctcgtcctg cagcactgcc acgccgtcaa caccgagttc acgacaccac tgccgttcac 7680  
 cgaagtacgc gccaccgcgc aatccatctc caaatggatc tggcgcaatt tcaccgaaga 7740  
 acagtaccga gcccgcacaag cgcatctcgg tcaaaaaggc ggcaaggcaa cgacactcgc 7800  
 caaacaagaa gccgtccgaa acaatgcaag aaagtacgac gaacatacga tgcgagaggc 7860  
 gattatctga tgggcgggagc caaaaatccg gtgcgccgaa agatgacggc agcagcagca 7920  
 gccgaaaaat tcggtgcctc cactcgcaca atccaacgct tgttttgctga gccgcgtgac 7980  
 gattacctcg gccgtgcgaa agctcgccgt gacaaagctg tcgagctgcg gaagcagggg 8040  
 ttgaagtacc gggaaatcgc cgaagcgatg gaactctcga ccgggatcgt cggccgatta 8100  
 ctgcacgacg cccgcaggca cggcgagatt tcagcggagg atctgtcggc gtaaccaagt 8160  
 cagcgggttg tcgggttcgc gccggcgctc ggcactcgga ccggccggcg gatggtgttc 8220  
 tgcctctggc gcagcgtcag ctaccgccga aggctgtca tcgaccggct tcgactgaag 8280  
 tatgagcaac gtcacagcct gtgattggat gatccgtca cgctcgaccg ctacctgttc 8340  
 agctgccgcc cgctgggcat gagcaacggc caactctcgt tcaa 8384

<210> 96

<211> 8388

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:vector pTip-QC2

<400> 96

gagctcgacc gcgcgggtcc cggacgggga agagcgggga gctttgccag agagcgacga 60  
 ctcccccttg cgttggtgat tgccggtcag ggcagccatc cgccatcgtc gcgtaggggtg 120  
 tcacacccca ggaatcgcgt cactgaacac agcagccggt aggacgacca tgactgagtt 180  
 ggacaccatc gcaaattccgt ccgatccgc ggtgcagcgg atcatcgatg tcaccaagcc 240  
 gtcacgatcc aacataaaga caacgttgat cgaggacgtc gagccctca tgcacagcat 300

cgcgggccggg gtggagttca tcgaggtcta cggcagcgac agcagtcctt ttccatctga 360  
gttgctggat ctgtgcgggc ggcagaacat accggtccgc ctcatcgact cctcgatcgt 420  
caaccagtgtt ttcaaggggg agcgggaaggc caagacattc ggcatcgccc gcgtccctcg 480  
cccggccagg ttcggcgata tcgcgagccg gcgtggggac gtctctgttc tcgacgggggt 540  
gaagatcgtc gggaacatcg gcgcgatagt acgcacgtcg ctgcgctcg gagcgtcggg 600  
gatcatcctg gtggacagtg acatcaccag catcgcgac cggcgtctcc aaagggccag 660  
ccgaggttac gtcttctccc ttcccgtcgt tctctccggt cgcgaggagg ccatcgccctt 720  
cattcgggac agcggtatgc agctgatgac gctcaaggcg gatggcgaca tttccgtgaa 780  
ggaactcggg gacaatccgg atcggtggc cttgctgttc ggcagcgaaa aggggtgggcc 840  
ttccgacctg ttcgaggagg cgtcttccgc ctcggtttcc atcccatga tgagccagac 900  
cgagtctctc aacgtttccg tttccctcgg aatcgcgctg cagcagagga tcgacaggaa 960  
tctcgcggcc aaccgataag cgcctctgtt cctcggacgc tcggttcctc gacctcgatt 1020  
cgtcagtgat gatcacctca cagggcagcg atcaccactg acatatcgag gtcaacggtc 1080  
gtggtccggg cgggcactcc tcgaaggcgc ggccgacgcc cttgaacgac tcgatgactc 1140  
tagacgcata cgaaacctcc acccactca cctagtcga catccgtacc ttggaaaccg 1200  
acctgtattg gcatttcagt tggacatcga ccagtggcgt tgctaggttc aagaccatgt 1260  
ccagcccga ggcgtccaga ctctagccac cggaggtagt ccggtggcca catcccgtcg 1320  
cgcccgaacg tcacgctctt gtgtggcctt cccttggtgt ttgcgatcag tggcacacct 1380  
ctaccgtctg aatttcgagt ctggcctcgg ctgcgcacat ctgcactgt gacgtgtca 1440  
ggtcaccgc ttcgcggcta ccagttcctt tcacgaatc gagcttcgg tgccgccgcg 1500  
cagcctccct gaccatcctc agattttatg gagtctcgca gtgcctttcg ctatctacgt 1560  
cctcgggctt gctgtcttcg ccagggcac atccgagttc atgttgctcg gactcatacc 1620  
ggacatggcc cgtgacctcg gggtttcggc cccgccgcc ggactcctca cctccgcctt 1680  
cgcggtcggg atgatcatcg gcgctccgtt gatggctatc gccagcatgc ggtggccccg 1740  
gcgacgcgc cttctgacat tcctcatcac gttcatgtg gtccacgtca tcggcgcgct 1800  
caccagcagc ttcgaggctt tgctggtcac acgcacgtg ggagccctcg ccaatgccgg 1860  
attcttggca gtggccctgg gggcggcgat ggcatgggtg cccgccgaca tgaaaggcg 1920  
cgccacgtcc gtctcctcg gcggtgtcac gatcgcatgt gtagccgggtg ttcccggggg 1980  
cgcttcctg ggtgaaatgt ggggctggcg tgcagcgttc tgggctgtcg tcgtcatctc 2040  
cgcccctgca gtggtggcga ttatgttcgc cccccggcc gagccgcttg cagagtccac 2100

accgaatgcc aagcgtgaac tgtcctcact gcgctcacgc aagctccagc tcatgcttgt 2160  
cctcggggcg ctgatcaacg gcgcaacgtt ctgttcgttc acgtacatgg cgcccacgct 2220  
caccgacatc tccggtttcg actcccgttg gattccgttg ctgctggggc tgttcgggct 2280  
cggatcgttc atcgggtgtca gcgtcggagg caggctcgcc gacaccggc cgttccaact 2340  
gctcgtgtc gggtcgcag cactgttgac gggatggatc gtcttcgctc tcacggcatc 2400  
ccaccccgcg gtgacattgg tgatgctgtt cgtgcagggc gctttgtcct tcgcggtcgg 2460  
ctcgactttg atctcccagg tgctctacgc cgccgacgcg gcaccgacct tgggtggatc 2520  
gttcgcgacg gccgcgttca acgtcgggtc tgcactggga ccggcgctcg gcgggttggc 2580  
gatcggcatg ggtctgagct accgcgccc gctctggacg agcgccgcgc tggtgacact 2640  
cgcatcgtc atcggcgcag ccacctgtc tctgtggcgg cgaccagcgt ctgtccacga 2700  
atctgtcccc gcctgaccag aaaccaggat ctgtgagtgt ggtgactgat ctgtgcacgc 2760  
tcagcagtca ccgcgcgctc gcgtcgtacc gagggccagc gccaacaggt gtgtggagct 2820  
ctgcccctgc ctctttcacg cgaactcact gttcagtgcg gcgatacgtg ctcggtgagt 2880  
tccactacag cgaccatgac tagaattgat ctctcgacc gccaatggg catctgagaa 2940  
tcatctgctt ttctcgcag caacgtactt gcaacgttgc aactcctagt gttgtgaatc 3000  
acacccacc ggggggtggg attgcagtca ccgatttggg ggggtgcgcc aggaagatca 3060  
cgtttacata ggagcttgca atgagctact ccgtgggaca ggtggccggc ttcccgagg 3120  
tgacggtgcg cacgctgcac cactacgacg acatcggcct gctcgtaccg agcgagcgca 3180  
gccacgcggg ccaccggcgc tacagcgacg ccgacctga ccggctgcag cagatcctgt 3240  
tctaccggga gctgggcttc ccgctcgacg aggtcgccgc cctgctcgac gacccggccg 3300  
cggacccgcg cgcgcacctg cgccgccagc acgagctgct gtccgcccgg atcgggaaac 3360  
tgcagaagat ggcggcggcc gtggagcagg cgatggaggc acgcagcatg ggaatcaacc 3420  
tcaccccgga ggagaagtgc gaggtcttcg gcgacttcga ccccgaccag tacgaggagg 3480  
aggtccggga acgctggggg aacaccgacg cctaccgcca gtccaaggag aagaccgcct 3540  
cgtacaccaa ggaggactgg cagcgcatcc aggacgaggc cgacgagctc acccggcgct 3600  
tcgtgccct gatggacgcg ggtgagcccg ccgactccga gggggcgatg gacgccgccg 3660  
aggaccaccg gcagggcacg gcccgcaacc actacgactg cgggtacgag atgcacacct 3720  
gcctgggcga gatgtacgtg tccgacgaac gtttcacgcg aaacatcgac gccccaagc 3780  
cgggcctcgc cgcctacatg cgcgacgca tcctcgccaa cgccgtccgg cacacccct 3840  
gagcgggtgt cgtggcccgg gtctcccgcc cggctctacc ccacggctca ctcccgggcc 3900



acgaccaccg ccgccccgta cgcgcacacc tcggtgcccc cgtccgccgc ctccgtcacg 3960  
tcgaaacgga agatccccgg gtaccgagct cgtcagggtg cacttttcgg ggaaatgtgc 4020  
gcggaacccc tatitgttta tttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg ctcatgagac 4080  
aataaccctg ataaatgctt caataatatt gaaaaaggaa gagtatgagt attcaacatt 4140  
tccgtgtcgc ccttattccc ttttttgcgg cattttgcct tcctgttttt gctcaccag 4200  
aaacgctggt gaaagtaaaa gatgctgaag atcagttggg tgcacgagtg ggttacatcg 4260  
aactggatct caacagcggg aagatccttg agagttttcg cccgaagaa cgttttccaa 4320  
tgatgagcac ttttaaagtt ctgctatgtg gcgcggtatt atcccgtatt gacgccgggc 4380  
aagagcaact cggtcgccgc atacactatt ctccagaatga cttgggttag tactcaccag 4440  
tcacagaaaa gcattcttac gatggcatga cagtaagaga attatgcagt gctgccataa 4500  
ccatgagtga taacactgcg gccaaacttac ttctgacaac gatcggagga ccgaaggagc 4560  
taaccgcttt ttgcacaac atgggggatc atgtaactcg ccttgatcgt tgggaaccgg 4620  
agctgaatga agccatacca aacgacgagc gtgacaccac gatgcctgta gcaatggcaa 4680  
caacgttgcg caaactatta actggcgaac tacttactct agcttcccgg caacaattaa 4740  
tagactggat ggaggcggat aaagttgcag gaccacttct gcgctcggcc cttccggctg 4800  
gctggtttat tgctgataaa tctggagccg gtgagcgtgg gtctcgcggt atcattgcag 4860  
cactggggcc agatggtaag cctccccgta tcgtagttat ctacacgacg gggagtcagg 4920  
caactatgga tgaacgaaat agacagatcg ctgagatagg tgcctcactg attaagcatt 4980  
ggtaactgtc agaccaagtt tactcatata tacttttagat tgatttaaaa cttcattttt 5040  
aatttaaaag gatctagggt aagatccttt ttgataatct catgacaaa atcccttaac 5100  
gtgagttttc gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttag 5160  
atcctttttt tctgcgcgta atctgtgtct tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg 5220  
tggtttgttt gccggatcaa gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact ggcttcagca 5280  
gagcgcagat accaaatact gttcttctag tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga 5340  
actctgtagc accgcctaca tacctcgtc tgctaatacct gttaccagtg gctgctgcca 5400  
gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttgg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc 5460  
agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga acgacctaca 5520  
ccgaactgag atacctacag cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc gaaggagaa 5580  
aggcggacag gtatccggtg agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc 5640  
cagggggaaa cgcctggtat ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc 5700

gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg 5760  
cctttttacg gttcctggcc ttttgctggc cttttgctca catgtttctt cctgcgttat 5820  
cccctgattc tgtggataac cgtattaccg cttttgagtg agctgatacc gctcgccgca 5880  
gccgaacgac cgagcgcagc gagtcagtga gcgaggaagc ggaagagcgc ccaatacgca 5940  
aaccgcctct ccccgcgctg tggccgattc attaatgcag ctggcacgac tagagtcccg 6000  
ctgaggcggc gtagcaggtc agccgcccc a gcggtggta ccaaccgggg tggaacggcg 6060  
ccggtatcgg gtgtgtcctg ggcgctcatt ccaacctccg tgtgtttgtg caggtttcgc 6120  
gtgttcagtc ccctcgcacc ggcacccgca gcgaggggct cacgggtgcc ggtgggtcga 6180  
ctagttcagtc gatggtgatg gtgatgctcg agagatctaa gcttggtacc gcggccgcta 6240  
cgtagaattc ccatggcgtg atggtgatgg tgatggcca tatgtatatc tccttcttaa 6300  
agttaaacia aattatttct agacgccgtc cacgctgcct cctcacgtga cgtgagggtc 6360  
aagcccggac gttccgctg ccacgccgtg agccgccgcg tgccgtcggc tccctcagcc 6420  
cgggcggccg tgggagcccg cctcgatatg tacacccgag aagctcccag cgtcctcctg 6480  
ggccgcgata ctcgaccacc acgcacgac accgcactaa cgattcggcc ggcgctcgat 6540  
tcggccggcg ctcgattcgg ccggcgctcg attcggccgg cgctcgattc ggccggcgct 6600  
cgattcggcc gagcagaaga gtgaacaacc accgaccag cttccgctct gcgcgccgta 6660  
cccgacctac ctcccgcagc tcgaagcagc tcccgggagt accgccgtac tcacccgcct 6720  
gtgctcacca tccaccgacg caaagcccaa cccgagcaca cctcttgac caaggtgccg 6780  
accgtggctt tccgctcgca gggttccaga agaaatcgaa cgatccagcg cggcaagggt 6840  
caaaaagcag gggttgggtg ggaggagggt ttgggggggtg tcgccgggat acctgatatg 6900  
gctttgtttt gcgtagtcga ataattttcc atatagctc ggcgctcgg actcgaatag 6960  
ttgatgtggg cgggcacagt tgcccatga aatccgcaac ggggggcgtg ctgagcgatc 7020  
ggcaatgggc ggatgcggtg ttgcttcgc accggccgtt cgcgacgaac aacctccaac 7080  
gaggtcagta ccgatgagc cgcgacgac cattggcaat gcggtacgtc gagcattcac 7140  
cgcacgcgtt gctcgatct atcgtcatcg actgcgatca cgttgacgcc gcgatgcgcg 7200  
cattcgagca accatccgac catccggcgc cgaactgggt cgcacaatcg ccgtccggcc 7260  
gcgcacacat cggatgggtg ctcggcccca accacgtgtg ccgcaccgac agcggccgac 7320  
tgacgccact gcgctacgcc caccgcatcg aaaccggcct caagatcagc gtcggcgcg 7380  
atttcgcgta tggcgggcaa ctgacaaaa acccgattca cccgattgg gagacgatct 7440  
acggcccggc caccctgtac acattgcggc agctggccac catccacaca ccccggcaga 7500

tgccgcgtcg gcccgatcgg gccgtgggcc tgggcccga cgtcaccatg ttgcagcca 7560  
 cccggcgatg ggcataccg cagtgggtggc aacaccgaaa cggaaccggc cgcgactggg 7620  
 accatctcgt cctgcagcac tgccacgccg tcaacaccga gttcacgaca ccaactgccgt 7680  
 tcaccgaagt acgcgccacc ggcgaatcca tctccaaatg gatctggcgc aatttcaccg 7740  
 aagaacagta ccgagcccga caagcgcac tcgggtcaaaa aggccgcaag gcaacgacac 7800  
 tcgccaacaa agaagccgtc cgaaacaatg caagaaagta cgacgaacat acgatgagag 7860  
 aggcgattat ctgatgggcg gagccaaaaa tccgggtgcgc cgaaagatga cggcagcagc 7920  
 agcagccgaa aaattcgggtg cctccactcg cacaatccaa cgcttggttg ctgagccgcg 7980  
 tgacgattac ctccggcgtg cgaaagctcg ccgtgacaaa gctgtcgagc tgcggaagca 8040  
 ggggttgaag taccgggaaa tcgccgaagc gatggaactc tcgaccggga tcgtcggccg 8100  
 attactgcac gacgcccga ggcacggcga gatttcagcg gaggatctgt cggcgtaacc 8160  
 aagtcagcgg gttgtcgggt tccggccggc gctcggcact cggaccggcc ggcggatggt 8220  
 gttctgcctc tggcgcagcg tcagctaccg ccgaaggcct gtcacgacc ggcttcgact 8280  
 gaagtatgag caacgtcaca gcctgtgatt ggatgatccg ctcacgctcg accgctacct 8340  
 gttcagctgc cgcccgctgg gcatgagcaa cggccaactc tcgttcaa 8388

<210> 97

<211> 8452

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:vector pTip-RC1

<400> 97

gttaacgacc gcgcgggtcc cggacgggga agagcgggga gctttgccag agagcgacga 60  
 cttccccttg cgttggtgat tgccggtcag ggcagccatc cgccatcgtc gcgtagggtg 120  
 tcacacccca ggaatcgcgt cactgaacac agcagccggt aggacgacca tgactgagtt 180  
 ggacaccatc gcaaattcgt ccgatccgc ggtgcagcgg atcatcgatg tcaccaagcc 240  
 gtcacgatcc aacataaaga caacgttgat cgaggacgtc gagcccctca tgcacagcat 300

cgcgggccggg gtggagttca tcgaggtcta cggcagcgac agcagtcctt ttccatctga 360  
gttgctggat ctgtgcgggc ggcagaacat accggtccgc ctcatcgact cctcgatcgt 420  
caaccagttg ttcaaggggg agcggaaggc caagacattc ggcatcgccc gcgtccctcg 480  
cccggccagg ttcggcgata tcgcgagccg gcgtggggac gtcgtcgttc tcgacgggggt 540  
gaagatcgtc gggaacatcg gcgcgatagt acgcacgtcg ctgcgcgtcg gagcgtcggg 600  
gatcatcctg gtggacagtg acatcaccag catcgcggaac cggcgtctcc aaagggccag 660  
ccgaggttac gtcttctccc ttcccgtcgt tctctccggt cgcgaggagg ccatcgcctt 720  
cattcgggac agcggtatgc agctgatgac gctcaaggcg gatggcgaca tttccgtgaa 780  
ggaactcggg gacaatccgg atcggttggc cttgctgttc ggcagcgaaa aggggtgggcc 840  
ttccgacctg ttcgaggagg cgtcttccgc ctcggtttcc atccccatga tgagccagac 900  
cgagtctctc aacgtttccg tttccctcgg aatcgcgctg cacgagagga tcgacaggaa 960  
tctcgcggcc aaccgataag cgcctctgtt cctcggacgc tcggttcctc gacctcgatt 1020  
cgtcagtgat gatcacctca cacggcagcg atcaccactg acatatcgag gtcaacggtc 1080  
gtggtccggg cgggcactcc tcgaaggcgc ggccgacgcc cttgaacgac tcgatgactc 1140  
tagacgcata cgaaacctcc accccactca cctagtccga catccgtacc ttggaaaccg 1200  
acctgtattg gcatttcagt tggacatcga ccagtggcgt tgctaggttc aagaccatgt 1260  
ccagcccgaa ggcgtccaga ctctagccac cggaggtagt ccggtggcca catcccgtcg 1320  
cgcccgaacg tcacgtcttt gtgtggcctt cccttggtgt ttgcgatcag tggcacacct 1380  
ctaccgtctg aatttcgagt ctggcctcgg ctgcgcacat ctgcgactgt gacgtgtca 1440  
ggtcaccgcg ttgcgggcta ccagttcctt tcatcgaatc gagcttccgg tgccgccgcg 1500  
cagcctccct gaccatcctc agattttatg gagtctcgca gtgcctttcg ctatctacgt 1560  
cctcgggctt gctgtcttcg ccagggcac atccgagttc atgttgtccg gactcatacc 1620  
ggacatggcc cgtgacctcg gggtttcggt ccccgccgcc ggactcctca cctccgcctt 1680  
cgcggtcggg atgatcatcg gcgctccgtt gatggctatc gccagcatgc ggtggccccg 1740  
gcgacgcgcc cttctgacat tcctcatcac gttcatgctg gtccacgtca tcggcgcgct 1800  
caccagcagc ttcgaggtct tgctggtcac acgcacgtg ggagccctcg ccaatgccgg 1860  
attcttggca gtggccctgg gggcggcgat ggcatgggtg cccgccgaca tgaaagggcg 1920  
cgccacgtcc gtcctcctcg gcggtgtcac gatcgcatgt gtagccggtg ttcccggggg 1980  
cgccttcctg ggtgaaatgt ggggctggcg tgcagcgttc tgggctgtcg tcgtcatctc 2040  
cgcccctgca gtggtggcga ttatgttcgc caccgccgcc gagccgcttg cagagtccac 2100

accgaatgcc aagcgtgaac tgtcctcact gcgctcacgc aagctccagc tcatgcttgt 2160  
cctcggggcg ctgatcaacg gcgcaacgtt ctgttcgttc acgtacatgg cgcccacgct 2220  
caccgacatc tccggtttcg actcccgttg gattccgttg ctgctggggc tgttcgggct 2280  
cggatcgttc atcgggtgtca gcgtcggagg caggctcgcc gacacccggc cgttccaact 2340  
gctcgtgttc ggggtccgcag cactgttgac gggatggatc gtcttcgctc tcacggcatc 2400  
ccaccccgcg gtgacattgg tgatgctgtt cgtgcagggc gctttgtcct tcgcggtcgg 2460  
ctcgactttg atctcccagg tgctctacgc cgccgacgcg gcaccgacct tgggtggatc 2520  
gttcgcgacg gccgcgttca acgtcgggtc tgcaactggga ccggcgctcg gcgggttggc 2580  
gatcggcatg ggtctgagct accgcgcccc gctctggacg agcgccgcg tggtgacact 2640  
cgcgatcgtc atcgggcgag ccaccttgct tctgtggcgg cgaccagcgt ctgtccacga 2700  
atctgtcccc gcctgaccag aaaccaggat ctgtgagtgt ggtgactgat ctgtgcacgc 2760  
tcagcagtca ccgcgcgctc gcgtcgtacc gagggccagc gccaacaggt gtgtggagct 2820  
ctgccccctgc ctctttcacg cgaactcact gttcagtgcg gcgatacgtg ctcggtgagt 2880  
tccactacag cgaccatgac tagaattgat ctctcgcacc gccaatggg catctgagaa 2940  
tcatctgcgt ttctcgcacg caacgtactt gcaacgttgc aactcctagt gttgtgaatc 3000  
acaccccacc ggggggtggg attgcagtca ccgatttggg ggggtgcgcc aggaagatca 3060  
cgtttacata ggagcttgca atgagctact ccgtgggaca ggtggccggc ttgcgccgag 3120  
tgacgggtgcg cacgctgcac cactacgacg acatcggcct gctcgtaccg agcgagcgca 3180  
gccacgcggg ccaccggcg ctagcgcacg ccgacctga ccggctgcag cagatcctgt 3240  
tctaccggga gctgggcttc ccgctcgacg aggtcgcgc cctgctcgac gacccggccg 3300  
cggacccgcg cgcgcacctg cgccgccagc acgagctgct gtccgcccgg atcgggaaac 3360  
tgcagaagat ggcggcggcc gtggagcagg cgatggaggc acgcagcatg ggaatcaacc 3420  
tcaccccgga ggagaagtgc gaggtcttcg gcgacttcga ccccgaccag tacgaggagg 3480  
aggtccggga acgctggggg aacaccgacg cctaccgcca gtccaaggag aagaccgcct 3540  
cgtacaccaa ggaggactgg cagcgcaccc aggaacgagc cgacgagctc accggcgct 3600  
tcgtcgccct gatggacgcg ggtgagccc cgcactcca gggggcgatg gacgcgcgcg 3660  
aggaccaccg gcagggcacg gcccgcaacc actacgactg cgggtacgag atgcacacct 3720  
gcctggggga gatgtacgtg tccgacgaac gtttcacgcg aaacatcgac gccgccaagc 3780  
cgggcctcgc cgcctacatg cgcgacgcga tcctcgcaa ccggtccgg cacaccccct 3840  
gagcgggtggg cgtggcccgg gtctccgcgc cgggtctacc ccacggctca ctcccgggcc 3900

acgaccaccg ccgccccgta cgcgcacacc tcgggtgcca cgtccgccgc ctccgtcacg 3960  
tcgaaacgga agatccccgg gtaccgagct cgtcagggtg cacttttcgg ggaaatgtgc 4020  
gcggaacccc tatttgttta tttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg ctcatgagac 4080  
aataaccctg ataaatgctt caataatatt gaaaaaggaa gagtatgagt attcaacatt 4140  
tccgtgtcgc ccttattccc ttttttgagg cattttgcct tcctgttttt gctcaccag 4200  
aaacgctggt gaaagtaaaa gatgctgaag atcagttggg tgcacgagt gggttacatc 4260  
aactggatct caacagcggg aagatccttg agagttttcg cccgaagaa cgttttccaa 4320  
tgatgagcac ttttaaagtt ctgctatgtg gcgcgggtatt atcccgtatt gacgccgggc 4380  
aagagcaact cggtcgccgc atacactatt ctccagaatga cttgggtgag tactcaccag 4440  
tcacagaaaa gcactttacg gatggcatga cagtaagaga attatgcagt gctgccataa 4500  
ccatgagtga taacactgcg gccaaacttac ttctgacaac gatcggagga ccgaaggagc 4560  
taaccgcttt tttgcacaac atgggggatc atgtaactcg ccttgatcgt tgggaaccgg 4620  
agctgaatga agccatacca aacgacgagc gtgacaccac gatgcctgta gcaatggcaa 4680  
caacgttgcg caaactatta actggcgaa cacttactct agcttcccgg caacaattaa 4740  
tagactggat ggaggcggat aaagttgcag gaccacttct gcgctcggcc cttccggctg 4800  
gctggtttat tgctgataaa tctggagccg gtgagcgtgg gtctcgcggg atcattgcag 4860  
cactggggcc agatggtaag cctccccgta tcgtagttat ctacacgacg gggagtcagg 4920  
caactatgga tgaacgaaat agacagatcg ctgagatagg tgcctcactg attaagcatt 4980  
ggtaactgtc agaccaagtt tactcatata tacttttagat tgatttaaaa cttcattttt 5040  
aattttaaag gatctagggt aagatccttt ttgataatct catgaccaa atccctaac 5100  
gtgagttttc gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag 5160  
atcctttttt tctgcgcgta atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg 5220  
tggtttgttt gccggatcaa gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact ggcttcagca 5280  
gagcgcagat accaaatact gttcttctag tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga 5340  
actctgtagc accgcctaca tacctcgctc tgctaatact gttaccagt gctgctgcca 5400  
gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttgg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc 5460  
agcggtcggg ctgaacgggg gggttcgtgca cacagcccag cttggagcga acgacctaca 5520  
ccgaactgag atacctacag cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc gaaggagaaa 5580  
aggcggacag gtatccggtg agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc 5640  
cagggggaaa cgcttggtat ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc 5700

gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg 5760  
ccttttttacg gttcctggcc ttttgctggc cttttgctca catgttcttt cctgcgttat 5820  
cccctgattc tgtggataac cgtattaccg cctttgagtg agctgatacc gctcgccgca 5880  
gccgaacgac cgagcgcagc gagtcagtga gcgaggaagc ggaagagcgc ccaatacgca 5940  
aaccgcctct ccccgcgcggt tggccgattc attaatgcag ctggcacgac tagagtcccg 6000  
ctgaggcggc gtagcaggtc agccgccccca gcggtgggtca ccaaccgggg tggaacggcg 6060  
ccggtatcgg gtgtgtccgt ggcgctcatt ccaacctcgg tgtgtttgtg caggtttcgc 6120  
gtgttgcaagt ccctcgcacc ggcacccgca gcgaggggct cacgggtgcc ggtgggtcga 6180  
ctagttcagt gatggatgatg gtgatgctcg agagatctaa gcttggatcc gcggccgcta 6240  
cgtagaattc ccatatgggtg atggatgatg tggcccatgg tatactctct tcttaaagtt 6300  
aaacaaaatt atttctagac gccgtccacg ctgcctcctc acgtgacgtg aggtgcaagc 6360  
ccggacgttc cgcgtgccac gccgtgagcc gccgcgtgcc gtcggctccc tcagcccggg 6420  
cggccgtggg agcccgcctc gatatgtaca agcatgggga ctgcgccgcg actagcggct 6480  
tcccgcacag ccgtactgac cagcagatca gcgataaacg ctgtttctgc tggttaagtg 6540  
gataaaaacc aaataatcga tgaacctcga agtggagtat ccgagctgaa ctagctggat 6600  
ttactccgaa aatacgagcg ggcacgaagg gtgttgacc accctgccgc cgccttcgag 6660  
gtcctactt gactaggacc ccgctcggtt tgaccagcgt aagtgtgaa cacctttccg 6720  
gcaaagaccg gccccctgtc ctcggtgtcg ccgataagcg cggcatccgg cacgaacttc 6780  
gacccaaact tcaacaaatc accacgtcag aaacttttaa tgcgtgcggc cggccgattt 6840  
ccggcgtgaa cgggtgtgacc atcgtaacg gtcccaaagg ttccggattt ggaggccttc 6900  
gtcctgcgg aaagggctgg atctgcccc tctgtgcggg aaaagtcggc gcacatcgag 6960  
cagacgaaat ttctcaagtt gttgctcatc aactcgggac tggatctgtt gcgatggtga 7020  
ccatgaccat gcgccatacc gctgggcagc gtttgcatga tttgtggact ggactttcgg 7080  
cagcctggaa agctgcgacc aatggccgcc gatggcgtac cgaacgtgaa atgtacggct 7140  
gcgacggata cgtacgagct gttgaaatca ctacaggaaa aaacggttgg cacgttcacg 7200  
tccagctct actcatgttc agcgggtgac tgagtgagaa catcctcgaa tccttctcgg 7260  
atgcgatgtt cgatcgggtg acctccaaac tcgtgtctct gggatttgct gcgccactac 7320  
gtaattcagg tggactcgac gtaagaaaga ttggtggaga agctgaccaa gttctcgtg 7380  
catacctgac gaaaattgca tccggggtcg gcatggaagt cggcagtggc gacggaaaaa 7440  
gtggtcggca cggcaaccgt gcaccttggg aaatcgccgt tgatgcagtc ggaggagatc 7500

cacaagcggtt ggaactctgg cgcgagtttg agttcggttc gatgggacgc cgagcaatcg 7560  
 catggtctcg tggactgcgc gcccgagctg gtcttggcgt agaactcacg gatgctcaga 7620  
 ttgtcgaaca ggaagaatct gccccgggtca tggttgcgat cattccggct cggtcctgga 7680  
 tgatgattcg gaactgtgcg ccttacgttt tcggagagat ccttggactc gtggaagcgg 7740  
 gcgcgacctg ggaaaacctt cgtgaccact tgcattatcg attgcctgca gcggatgtgc 7800  
 ggcctccgat aatatcgatt cgtaagtga atgtcttggt gtgcaacaac tttcactcgt 7860  
 atgaaccaca cttgagggca tcccccgat acttgccgct ttgaagctgg gtgtctctct 7920  
 gtcagggtcg cgatagcacc gcgtagcggc ttggccttga cagagagacg gcctgtttca 7980  
 tggtttggtct cggggggctg accgggcaga tagaaaaagg ccggccgatt tggctgccga 8040  
 ctatttttgc aggtaaacct atctcatgag catcaatgaa cgtcccgttg gtatcgcagc 8100  
 gaatgcagct tcggtagacg tcgatggcgt tgtgatgggt gtgtatctct cgctttatgg 8160  
 gcaagaaatc acgctagatc gagatgatgc gttcctactc ctcgatcgac ttcaggacgc 8220  
 gttgcgacct caagccaact aagaaccctc cagatggtct aaacgaggcg caaactcgct 8280  
 cctgggcctg cgggcgggagc accgaagcgc gagcgaagcg gagcgcgtag gtggggggagc 8340  
 ctgcgggcag cggcggcgga gccgccgcct tggtaatagg tgatcatcgg ggccatagca 8400  
 ggtcagagga tgtttttacg atgactcatg ctcaccacgc caagtactga tg 8452

<210> 98

<211> 8456

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:vector pTip-RC2

<400> 98

gttaacgacc gcgcgggtcc cggacgggga agagcgggga gctttgccag agagcgacga 60  
 cttccccttg cgttggtgat tgccggtcag ggcagccatc cgccatcgtc gcgtaggggtg 120  
 tcacacccca ggaatcgct cactgaacac agcagccggt aggacgacca tgactgagtt 180  
 ggacaccatc gcaaattcgt ccgatcccgc ggtgcagcgg atcatcgatg tcaccaagcc 240



gtcacgatcc aacataaaga caacgttgat cgaggacgtc gagcccctca tgcacagcat 300  
cgcgggccggg gtggagttca tcgaggtcta cggcagcgac agcagtcctt ttccatctga 360  
gttgctggat ctgtgcgggc ggcagaacat accggtccgc ctcatcgact cctcgatcgt 420  
caaccagttg ttcaaggggg agcggaaggc caagacattc ggcatcgccc gcgtccctcg 480  
cccggccagg ttcggcgata tcgcgagccg gcgtggggac gtcgtcgttc tcgacggggg 540  
gaagatcgtc gggaacatcg gcgcgatagt acgcacgtcg ctcgcgctcg gagcgtcggg 600  
gatcatcctg gtggacagtg acatcaccag catcgcgac cggcgctctc aaagggccag 660  
ccgaggttac gtcttctccc ttcccgtcgt tctctccggt cgcgaggagg ccatcgcctt 720  
cattcgggac agcggtatgc agctgatgac gctcaaggcg gatggcgaca tttccgtgaa 780  
ggaactcggg gacaatccgg atcggctggc cttgctgttc ggcagcgaaa aggggtgggc 840  
ttccgacctg ttcgaggagg cgtcttccgc ctcggtttcc atcccatga tgagccagac 900  
cgagtctctc aacgtttccg tttccctcgg aatcgcgctg cagcagagga tcgacaggaa 960  
tctcgcggcc aaccgataag cgcctctgtt cctcggaagc tcggttcctc gacctcgatt 1020  
cgtcagtgat gatcacctca cagggcagcg atcaccactg acatatcgag gtcaacggtc 1080  
gtggtccggg cgggcactcc tcgaaggcgc ggccgacgcc cttgaacgac tcgatgactc 1140  
tagacgcata cgaaacctcc accccactca cctagtccga catccgtacc ttggaaaccg 1200  
acctgtattg gcatttcagt tggacatcga ccagtggcgt tgctaggttc aagaccatgt 1260  
ccagcccga ggcgtccaga ctctagccac cggaggtagt ccggtggcca catcccgtcg 1320  
cgcccgaacg tcacgctctt gtgtggcctt cccttggtgt ttgcgatcag tggcacacct 1380  
ctaccgtctg aatttcgagt ctggcctcgg ctgcgcacat ctgcactgt gacgctgtca 1440  
ggtcaccgc ttcgcggcta ccagttcctt tcatcgaatc gagcttcggg tgccgccgcg 1500  
cagcctccct gaccatcctc agattttatg gagtctcgca gtgcctttcg ctatctacgt 1560  
cctcgggctt gctgtcttcg ccagggcac atccgagttc atgttgctcg gactcatacc 1620  
ggacatggcc cgtgacctcg gggtttcggg ccccgccgcc ggactcctca cctccgcctt 1680  
cgcggtcggg atgatcatcg gcgctccgtt gatggctatc gccagcatgc ggtggccccg 1740  
gcgacgcgc cttctgacat tcctcatcac gttcatgctg gtccacgtca tcggcgcgct 1800  
caccagcagc ttcgaggtct tgctggtcac acgcacgtg ggagccctcg ccaatgccgg 1860  
attcttgga gtggccctgg gggcggcgat ggcatgggtg cccgccgaca tgaaagggcg 1920  
cgccacgtcc gtcctcctcg gcggtgtcac gatcgcatgt gtagccggtg ttcccggggg 1980  
cgccttcctg ggtgaaatgt ggggctggcg tgcagcgttc tgggctgtcg tcgtcatctc 2040

cgccccctgca gtggtggcga ttatgttcgc cccccggcc gagccgcttg cagagtccac 2100  
accgaatgcc aagcgtgaac tgtcctcact gcgctcacgc aagctccagc tcatgcttgt 2160  
cctcggggcg ctgatcaacg gcgcaacgtt ctgttcgttc acgtacatgg cgcccacgct 2220  
caccgacatc tccggtttcg actcccgttg gattccgttg ctgctggggc tgttcgggct 2280  
cggatcgttc atcgggtgtca gcgtcggagg caggctcgcc gacacccggc cgttccaact 2340  
gctcgtgtc ggggtccgcag cactgttgac gggatggatc gtcttcgctc tcacggcatc 2400  
ccaccccgcg gtgacattgg tgatgctgtt cgtgcagggc gctttgtcct tcgcggtcgg 2460  
ctcgactttg atctcccagg tgctctacgc cgccgacgcg gcaccgacct tgggtggatc 2520  
gttcgcgacg gccgcgttca acgtcgggtgc tgcactggga ccggcgctcg gcgggttggc 2580  
gatcggcatg ggtctgagct accgcgcccc gctctggacg agcgccgcgc tggtgacact 2640  
cgcgatcgtc atcgggcgcag ccaccttgtc tctgtggcgg cgaccagcgt ctgtccacga 2700  
atctgtcccc gcctgaccag aaaccaggat ctgtgagtgt ggtgactgat ctgtgcacgc 2760  
tcagcagtca ccgcgcgctc gcgtcgtacc gagggccagc gccaacaggt gtgtggagct 2820  
ctgccccctgc ctctttcacg cgaactcact gttcagtgcg gcgatacgtg ctcggtgagt 2880  
tccactacag cgaccatgac tagaattgat ctctcgacc gccaatggg catctgagaa 2940  
tcatctgcgt ttctcgcacg caacgtactt gcaacgttgc aactcctagt gttgtgaatc 3000  
acaccccacc ggggggtggg attgcagtca ccgatttggg ggggtgcgcc aggaagatca 3060  
cgtttacata ggagcttgca atgagctact ccgtgggaca ggtggccggc ttcgccggag 3120  
tgacgggtgcg cacgctgcac cactacgacg acatcggcct gctcgtaccg agcgagcgca 3180  
gccacgcggg ccaccggcgc tacagcgacg ccgacctga ccggctgcag cagatcctgt 3240  
tctaccggga gctgggcttc ccgctcgacg aggtcgccgc cctgctcgac gaccggccg 3300  
cggacccgcg cgcgcacctg cgccgccagc acgagctgct gtccgcccgg atcgggaaac 3360  
tgcagaagat ggcgggcgcc gtggagcagg cgatggaggc acgcagcatg ggaatcaacc 3420  
tcaccccgga ggagaagttc gaggtcttcg gcgacttcga ccccgaccag tacgaggagg 3480  
aggtccggga acgctggggg aacaccgacg cctaccgcca gtccaaggag aagaccgcct 3540  
cgtaaccaa ggaggactgg cagcgcaccc aggacgaggc cgacgagctc accggcgct 3600  
tcgtcgccct gatggacgcg ggtgagcccg ccgactccga gggggcgatg gacgccgccg 3660  
aggaccaccg gcagggcatc gccgcaacc actacgactg cgggtacgag atgcacacct 3720  
gcctgggcga gatgtacgtg tccgacgaac gtttcacgcg aaacatcgac gccccaagc 3780  
cgggcctcgc cgcctacatg cgcgacgca tcctcgccaa cgccgtccgg cacacccct 3840

gagcgggtggt cgtggcccgg gtctcccgcc cggcttcacc ccacggctca ctcccggggc 3900  
acgaccaccg ccgtcccgtg cgcgcacacc tcggtgcccga cgtccgcccgc ctccgtcacg 3960  
tcgaaacgga agatccccgg gtaccgagct cgtcagggtg cacttttcgg ggaaatgtgc 4020  
gcggaacccc tatttgttta tttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg ctcatgagac 4080  
aataaccctg ataaatgctt caataatatt gaaaaaggaa gagtatgagt attcaacatt 4140  
tccgtgtcgc ccttattccc ttttttgccg cattttgcct tcctgttttt gctcaccag 4200  
aaacgctggt gaaagtaaaa gatgctgaag atcagttggg tgcacgagtg ggttacatcg 4260  
aactggatct caacagcggg aagatccttg agagttttcg cccgaagaa cgttttccaa 4320  
tgatgagcac ttttaaagtt ctgctatgtg gcgcggtatt atcccgtatt gacgcggggc 4380  
aagagcaact cggtcgcccgc atacactatt ctcagaatga cttgggtgag tactcaccag 4440  
tcacagaaaa gcatcttacg gatggcatga cagtaagaga attatgcagt gctgccataa 4500  
ccatgagtga taacactgcg gccaaacttac ttctgacaac gatcggagga ccgaaggagc 4560  
taaccgcttt tttgcacaac atgggggatc atgtaactcg ccttgatcgt tgggaaccgg 4620  
agctgaatga agccatacca aacgacgagc gtgacaccac gatgcctgta gcaatggcaa 4680  
caacgttgcg caaactatta actggcgaac tacttactct agcttcccgg caacaattaa 4740  
tagactggat ggaggcggat aaagttgcag gaccacttct gcgctcggcc cttccggctg 4800  
gctggtttat tgctgataaa tctggagccg gtgagcgtgg gtctcgcggg atcattgcag 4860  
cactggggcc agatggtaag ccctcccgtg tcgtagttat ctacacgacg gggagtcagg 4920  
caactatgga tgaacgaaat agacagatcg ctgagatagg tgcctcactg attaagcatt 4980  
ggtaactgtc agaccaagtt tactcatata tacttttagat tgatttataaa cttcattttt 5040  
aatttaaaag gatctagggt aagatccttt ttgataatct catgaccaa atcccttaac 5100  
gtgagttttc gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag 5160  
atcctttttt tctgcgcgta atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg 5220  
tggtttgttt gccggatcaa gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact ggcttcagca 5280  
gagcgcagat accaaatact gttcttctag tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga 5340  
actctgtagc accgcctaca tacctcgctc tgctaatacct gttaccagtg gctgctgcca 5400  
gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc 5460  
agcggtcggg ctgaacgggg gggttcgtgca cacagcccag cttggagcga acgacctaca 5520  
ccgaactgag atacctacag cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc gaaggagaa 5580  
aggcggacag gtatccggta agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc 5640

cagggggaaa cgcttggtat ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc 5700  
gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg 5760  
cctttttacg gttcctggcc ttttgctggc cttttgctca catgttcttt cctgcgttat 5820  
cccctgattc tgttgataac cgtattaccg cttttgagtg agctgatacc gctcgccgca 5880  
gccgaacgac cgagcgcagc gagtcagtga gcgaggaagc ggaagagcgc ccaatacgca 5940  
aaccgcctct ccccgcgctg tggccgattc attaatgcag ctggcacgac tagagtcccg 6000  
ctgaggcggc gtagcaggtc agccgcccc a gcggtggtca ccaaccgggg tggaacggcg 6060  
ccggtatcgg gtgtgtccgt ggcgtcatt ccaacctccg tgtgtttgtg caggtttcgc 6120  
gtgttgcaagt ccctcgcacc ggcacccgca gcgaggggct cacgggtgcc ggtgggtcga 6180  
ctagttcagt gatggtgatg gtgatgctcg agagatctaa gcttgatcc gcggccgcta 6240  
cgtagaattc ccatggcgtg atggtgatgg tgatggccca tatgtatatc tccttcttaa 6300  
agttaaacia aattatttct agacgccgtc cacgctgcct cctcacgtga cgtgaggtgc 6360  
aagcccgga cgttcgcgtg ccacgccgtg agccgccgcg tgcgctcggc tccctcagcc 6420  
cgggcgcccg tgggagcccg cctcgatatg tacaagcatg gggactcgcc gcggactagc 6480  
ggcttcccga cacgccgtac tgaccagcag atcagcgata aacgctgttt ctgctggtta 6540  
agtggataaa aaccaaataa tcgatgaacc tcgaagtga gtatccgagc tgaactagct 6600  
ggatttactc cgaaaatacg agcggcgacg aagggtgttg gaccaccctg ccgccgcctt 6660  
cgaggctcct acttgactag gaccccgctc gttatgacca gcgtaagtgc tgaacacctt 6720  
tccggcaaag accggccccc tgtcctcgtg tcgtccgata agcgcggcat ccggcacgaa 6780  
cttcgacca aacttcaaca aatcaccag tcagaaactt ttaatgcgtg cggccggccg 6840  
atttcggcg tgaacggtgt gaccatcgtc aacggtcca aagggtccgg atttgaggc 6900  
cttcgtcct gcggaaagg ctggatctgc ccctgctgtg cgggaaaagt cggcgcacat 6960  
cgagcagacg aaatttctca agttgttgct catcaactcg ggactggatc tgttgcgatg 7020  
gtgaccatga ccatgcgcca taccgctggg cagcgtttgc atgatttgtg gactggactt 7080  
tcggcagcct ggaaagctgc gaccaatggc cgccgatggc gtaccgaac tgaatgtac 7140  
ggctgcgacg gatacgtacg agctgttgaa atcactcacg gaaaaaacgg ttggcacgtt 7200  
cacgtccacg ctctactcat gttcagcggg gacgtgagtg agaacatcct cgaatcctt 7260  
tcggatgcga tgttcgatcg gtggacctcc aaactcgtgt ctctgggatt tgctgcgcca 7320  
ctacgtaatt cagggtggact cgacgtaaga aagattggtg gagaagctga ccaagttctc 7380  
gctgcatacc tgacgaaaat tgcacccggg gtcggcatgg aagtcggcag tggcgacgga 7440

aaaagtggtc ggcacggcaa ccgtgcacct tgggaaatcg ccgttgatgc agtcggagga 7500  
gatccacaag cggttggaact ctggcgcgag tttgagttcg gttcgatggg acgccgagca 7560  
atcgcatggt ctctgtggact gcgcgcccga gctggtcttg gcgtagaact cacggatgct 7620  
cagattgtcg aacaggaaga atctgccccg gtcattggtt cgatcattcc ggctcgggtcc 7680  
tggatgatga ttcggaactg tgcgccttac gttttcggag agatccttgg actcgtggaa 7740  
gcgggcgcgga cctgggaaaa ccttcgtgac cacttgcatt atcgattgcc tgcagcggat 7800  
gtgcggcctc cgataatatc gattcgtaag tgaaatgtct tgggtgtgcaa caactttcac 7860  
tcgtatgaac cacacttgag ggcatcccc cgatacttgc cgctttgaag ctgggtgtct 7920  
ctctgtcagg gctgcgatag caccgcgtag cggcttggcc ttgacagaga gacggcctgt 7980  
ttcatgggtg gtctcggggg gctgaccggg cagatagaaa aaggccggcc gatttggctg 8040  
ccgactatct ttgcaggtaa acccatctca tgagcatcaa tgaacgtccc gttggtatcg 8100  
cagcgaatgc agcttcggta gacgtcgatg gcgttgtgat ggggtgtgtat ctctcgcttt 8160  
atgggcaaga aatcacgcta gatcgagatg atgcgttcct actcctcgat cgacttcagg 8220  
acgcgttgcg acctcaagcc aactaagaac cctccagatg gtctaaacga ggcgcaaact 8280  
cgctcctggg cctgcggggc gagcaccgaa gcgcgagcga agcggagcgc gtaggtgggg 8340  
gagcctgcgg gcagcggcgg cggagccgcc gccttggtaa taggtgatca tcggggccat 8400  
agcaggtcag aggatgtttt tacgatgact catgctcacc acgccaagta ctgatg 8456

<210> 99

<211> 5984

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:vector pNit-QT1

<400> 99

gttaactaga gtaacgggct actccgttta acggaccccg ttctcacgct ttaggcttga 60  
ccccggagcc tgcattggggc attccgccgt gaaccgggtg gaatgcccc ggcacccggg 120  
ctttccagca aagatcacct ggccgccgatg agtaaggcgt acagaaccac tccacaggag 180

gaccgtcgag atgaaatcta acaatgcgct catcgtcac ctcggcaccg tcaccctgga 240  
tgctgtaggc ataggcttgg ttatgccggt actgccgggc ctcttgcggg atatcgtcca 300  
ttccgacagc atcgccagtc actatggcgt gctgctagcg ctatatgcgt tgatgcaatt 360  
tctatgcgca cccgttctcg gagcactgtc cgaccgcttt ggccgcccgc cagtcctgct 420  
cgcttcgcta cttggagcca ctatcgacta cgcgatcatg gcgaccacac ccgtcctgtg 480  
gattctctac gccggacgca tcgtggccgg catcaccggc gccacaggtg cggttgcttg 540  
cgcctatata gccgacatca ccgatgggga agatcgggct cgccacttcg ggctcatgag 600  
cgcttgtttc ggcggtggga tgggtggcagg ccccggtggc gggggactgt tgggcgccat 660  
ctccttgcac gcaccattcc ttgcggcggc ggtgctcaac ggccctcaacc tactactggg 720  
ctgcttccta atgcaggagt cgcataaggg agagcgtcgt ccgatgccct tgagagcctt 780  
caaccagtc agctccttcc ggtgggcgcg gggcatgact atcgtcgccg cacttatgac 840  
tgtcttcttt atcatgcaac tcgtaggaca ggtgccggca gcgctctggg tcattttcgg 900  
cgaggaccgc tttcgctgga gcgcgacgat gatcggcctg tcgcttgcgg tattcggaat 960  
cttgcaagcc ctcgctcaag ccttcgtcac tggccccgc accaaacgtt tcggcgagaa 1020  
gcaggccatt atcgccggca tggcgccga cgcgctgggc tacgtcttgc tggcgttcgc 1080  
gacgcgaggc tggatggcct tccccattat gattcttctc gcttcggcg gcacgaggat 1140  
gcccgcgttg caggccatgc tgtccaggca ggtagatgac gaccatcagg gacagcttca 1200  
aggatcgctc gcggtcttta ccagcctaac ttcgatcatt ggaccgctga tcgtcacggc 1260  
gatttatgcc gcctcggcga gcacatggaa cgggttgga tggattgtag gcgccgccct 1320  
ataccttgtc tgctccccg cgttgcgctc cggtgcatgg agccgggcca cctcgacctg 1380  
aatggaagcc ggcggcacct cgctaacgga ttcaccactc caagaattgg agccaatcaa 1440  
ttcttgcgga gaactgtgaa tgcgcaaacc aacccttggc agaacatata catcgctcc 1500  
gccatctcca gcagccgcac gcggcgcatc tcgggcagcg ttgggtcctg gccacgggtg 1560  
cgcatgatcg tgctcctgtc gttgaggta cgcgctcgtc aggtggcact ttcggggaa 1620  
atgtgcgcg aaccctatt tgtttatttt tctaaataca ttcaaataatg tatccgctca 1680  
tgagacaata accctgataa atgcttcaat aatattgaaa aaggaagagt atgagtattc 1740  
aacatttccg tgctgccctt attccctttt ttgcggcatt ttgccttct gttttgtc 1800  
accagaaac gctgggtgaaa gtaaaagatg ctgaagatca gttgggtgca cgagtgggtt 1860  
acatcgaact ggatctcaac agcggtaaga tccttgagag ttttcgcccc gaagaacgtt 1920  
ttccaatgat gagcactttt aaagtctgc tatgtggcgc ggtattatcc cgtattgacg 1980

ccgggcaaga gcaactcggg cgccgcatac actatttctca gaatgacttg gttgagtact 2040  
 caccagtcac agaaaagcat cttacggatg gcatgacagt aagagaatta tgcagtgtg 2100  
 ccataaccat gagtgataac actgcggcca acttacttct gacaacgatc ggaggaccga 2160  
 aggagctaac cgcttttttg cacaacatgg gggatcatgt aactcgcctt gatcggtggg 2220  
 aaccggagct gaatgaagcc ataccaaacg acgagcgtga caccacgatg cctgtagcaa 2280  
 tggcaacaac gttgcgcaaa ctattaactg gcgaactact tactctagct tcccggcaac 2340  
 aattaataga ctggatggag gcggataaag ttgcaggacc acttctgcgc tcggcccttc 2400  
 cggctggctg gtttattgct gataaatctg gagccgggtga gcgtgggtct cgcggtatca 2460  
 ttgcagcact ggggccagat ggtaagccct cccgtatcgt agttatctac acgacgggga 2520  
 gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac agatcgctga gataggtgcc tcaactgatta 2580  
 agcattggta actgtcagac caagtttact catatatact ttagattgat ttaaaacttc 2640  
 atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga tcctttttga taatctcatg accaaaatcc 2700  
 cttaacgtga gttttcgttc cactgagcgt cagaccccggt agaaaagatc aaaggatctt 2760  
 cttgagatcc tttttttctg cgcgtaatct gctgcttgca aacaaaaaaa ccaccgtac 2820  
 cagcgggtgt ttgtttgccc gatcaagagc taccaactct tttccgaag gtaactggct 2880  
 tcagcagagc gcagatacca aatactgttc ttctagtgtg gccgtagtta ggccaccact 2940  
 tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg 3000  
 ctgccagtgg cgataagtgc tgtcttacog ggttggactc aagacgatag ttaccggata 3060  
 aggcgcagcg gtcgggctga acgggggggt cgtgcacaca gccagcttg gagcgaacga 3120  
 cctacaccga actgagatac ctacagcgtg agctatgaga aagcgccacg cttcccgaag 3180  
 ggagaaaggc ggacaggtat ccggtaagcg gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg 3240  
 agcttccagg gggaaacgcc tggatatctt atagtccgtg cgggtttcgc cacctctgac 3300  
 ttgagcgtcg atttttgtga tgctcgtcag gggggcggag cctatggaaa aacgccagca 3360  
 acgcggcctt ttacagggtc ctggcctttt gctggccttt tgctcacatg ttctttcctg 3420  
 cgttatcccc tgattctgtg gataaccgta ttaccgcctt tgagtgtgct gataccgctc 3480  
 gccgcagccg aacgaccgag cgcagcaggt cagtgtgaga ggaagcggaa gagcgcccaa 3540  
 tacgcaaacc gcctctcccc gcgcgttggc cgattcatta atgcagctgg cacgactaga 3600  
 gtcccgtga ggccggcgtg caggtcagcc gcccagcgg tggtcaccaa ccgggggtgga 3660  
 acggcgccgg tatcgggtgt gtccgtggcg ctcatccaa cctccgtgtg tttgtgcagg 3720  
 tttcgcgtgt tgcagtcctt cgcaccggca cccgcagcga ggggctcacg ggtgccgggtg 3780

ggtcgactag ttcagtgatg gtgatggtga tgctcgagag atctaagctt ggatccgcgg 3840  
ccgctacgta gaattcccat atggtgatgg tgatggtggc ccatggtata tctccttctt 3900  
aaagttaaac aaaattatit ctagacgccg tccattatac ctcttcacgt gacgtgaggt 3960  
gcaagcccgg acgttccgcg tgccacgccg tgagccgccg cgtgccgtcg gctccctcag 4020  
cccggggcggc cgtggggagcc cgctcgcata tgtacaccgc agaagctccc agcgtcctcc 4080  
tgggcccgcga tactcgacca ccacgcacgc acaccgcact aacgattcgg ccggcgctcg 4140  
attcggccgg cgctcgattc ggccggcgct cgattcggcc ggcgctcgat tcggccggcg 4200  
ctcgattcgg ccgagcagaa gagtgaacaa ccaccgacca cgcttcgcgt ctgcgcgccg 4260  
taccgcacct acctcccgca gctcgaagca gctcccgga gtaccgcgt actcaccgc 4320  
ctgtgctcac catccaccga cgaaagccc aaccgcagca cacctcttgc accaaggtgc 4380  
cgaccgtggc tttccgctcg cagggttcca gaagaaatcg aacgatccag cgcggcaagg 4440  
ttcaaaaagc aggggttggg ggggaggagg ttttgggggg tgctgccggg atacctgata 4500  
tggttttggg ttgcgtagtc gaataatit ccatatagcc tcggcgcgtc ggactcgaat 4560  
agttgatgtg ggccgggcaca gttgccccat gaaatccgca acggggggcg tgctgagcga 4620  
tcggcaatgg gcggatgcgg tgttgcttcc gcaccggccg ttgcgcagca acaacctcca 4680  
acgaggtcag taccggatga gccgcgacga cgcattggca atgcggtacg tcgagcattc 4740  
accgcacgcg ttgctcggat ctatcgtcat cgactgcgat cacgttgacg ccgcgatgcg 4800  
cgcatcagag caaccatccg accatccggc gccgaactgg gtgcgacaat cgccgtccgg 4860  
ccgcgcacac atcggatggt ggctcggccc caaccacgtg tgccgcaccg acagcgcccg 4920  
actgacgcca ctgcgctacg cccaccgcct cgaaaccggc ctcaagatca gcgtcggcgg 4980  
cgatttcgcg tatggcgggc aactgaccaa aaaccgatt caccgcgatt gggagacgat 5040  
ctacggcccg gccaccccggt acacattgcg gcagctggcc accatccaca caccgcgga 5100  
gatgccgcgt cggcccgatc gggccgtggg cctggggccgc aacgtcacca tgctcgacgc 5160  
caccgcgga tgggcatacc cgcagtgggt gcaacaccga aacggaaccg gccgcgactg 5220  
ggaccatctc gtctgcagc actgccacgc cgtcaacacc gagttcacga caccactgcc 5280  
gttcaccgaa gtacgcgcca ccgcgcaatc catctccaaa tggatctggc gcaatttcac 5340  
cgaagaacag taccgagccc gacaagcgca tctcgggtcaa aaaggcggca aggcaacgac 5400  
actcgccaaa caagaagccg tccgaaacaa tgcaagaaag tacgacgaac atacgatgcg 5460  
agaggcgatt atctgatggg cggagccaaa aatccggtgc gccgaaagat gacggcagca 5520  
gcagcagccg aaaaattcgg tgcctccact cgcacaatcc aacgcttggt tgctgagccg 5580



cgtgacgatt acctcggccg tgcgaaagct cgccgtgaca aagctgtcga gctgcggaag 5640  
 caggggttga agtaccggga aatcgccgaa gcgatggaac tctcgaccgg gatcgtcggc 5700  
 cgattactgc acgacgcccg caggcacggc gagatttcag cggaggatct gtcggcgtaa 5760  
 ccaagtcagc gggttgtcgg gttccggccg gcgctcggca ctcgaccgg cggcgcgatg 5820  
 gtgttctgcc tctgggcgag cgtcagctac cgccgaaggc ctgtcatcga ccggcttcga 5880  
 ctgaagtatg agcaacgtca cagcctgtga ttggatgac cgctcacgct cgaccgctac 5940  
 ctgttcagct gccgcccgt gggcatgagc aacggccaac tctc 5984

<210> 100

<211> 5988

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:vector pNit-QT2

<400> 100

gttaactaga gtaacgggct actccgttta acggaccccg ttctcacgct ttaggcttga 60  
 ccccgagacc tgcattggggc attccgccgt gaaccgggtg gaatgcccc ggcacccggg 120  
 ctttccagca aagatcacct ggccgcatg agtaaggcgt acagaaccac tccacaggag 180  
 gaccgtcgag atgaaatcta acaatgcgct catcgctatc ctgggcaccg tcaccctgga 240  
 tgctgtaggc ataggcttgg ttatgccggt actgccgggc ctcttgccggg atatcgtcca 300  
 ttccgacagc atcgccagtc actatggcgt gctgctagcg ctatatgcgt tgatgcaatt 360  
 tctatgcgca cccgttctcg gagcactgtc cgaccgcttt ggccgcccgc cagtcctgct 420  
 cgcttcgcta cttggagcca ctatcgacta cgcgatcatg gcgaccacac ccgtcctgtg 480  
 gattctctac gccggacgca tcgtggccgg catcacggc gccacagggt cggttgctgg 540  
 cgcctatatc gccgacatca ccgatgggga agatcgggct cgccacttcg ggctcatgag 600  
 cgcttggttc ggcgtaggta tggtaggcagg ccccgtaggc gggggactgt tgggcgcat 660  
 ctcttgcat gcaccattcc ttgcggcggc ggtgctcaac ggctcaacc tactactggg 720  
 ctgcttccta atgcaggagt cgcataaggg agagcgtcgt ccgatgccct tgagagcctt 780  
 caaccagtc agctccttcc ggtgggcgcg gggcatgact atcgtcgccc cacttatgac 840

tgtcttcttt atcatgcaac tcgtaggaca ggtgccggca gcgctctggg tcattttcgg 900  
cgaggaccgc tttcgctgga gcgcgacgat gatcggcctg tcgcttgagg tattcggaat 960  
cttgcacgcc ctgcctcaag ccttcgtcac tgggtccgcc accaaacgtt tcggcgagaa 1020  
gcaggccatt atcgccggca tggcggccga gcgcttgagg tacgtcttgc tggcgttcgc 1080  
gacgcgaggc tggatggcct tccccattat gattcttctc gcttcgggcg gcatcgggat 1140  
gcccgcgttg caggccatgc tgtccaggca ggtagatgac gaccatcagg gacagcttca 1200  
aggatcgctc gcggctctta ccagcctaac ttcgatcatt ggaccgctga tcgtcacggc 1260  
gatttatgcc gcctcggcga gcacatggaa cgggttggca tggattgtag gcgccgccct 1320  
ataccttgct tgcctccccg cgttgcgctc cgggtgatgg agccgggcca cctcgacctg 1380  
aatggaagcc ggccggcacct cgctaacgga ttcaccactc caagaattgg agccaatcaa 1440  
ttcttgcgga gaactgtgaa tgcgcaaacc aacccttggc agaacatata catcgcgctc 1500  
gccatctcca gcagccgcac gcggcgcatc tcgggcagcg ttgggtcctg gccacgggtg 1560  
cgcatgatcg tgctcctgtc gttgaggtac cgagctcgtc aggtggcact tttcggggaa 1620  
atgtgcgagg aacccttatt tgtttatttt tctaaataca ttcaaataatg tatccgctca 1680  
tgagacaata accctgataa atgcttcaat aatattgaaa aaggaagagt atgagtattc 1740  
aacatttccg tgtcgccctt attccctttt ttgcggcatt ttgccttcct gtttttgctc 1800  
accagaaac gctggtgaaa gtaaaagatg ctgaagatca gttgggtgca cgagtgggtt 1860  
acatcgaact ggatctcaac agcggtaaga tccttgagag ttttcgcccc gaagaacgtt 1920  
ttccaatgat gagcactttt aaagttctgc tatgtggcgc ggtattatcc cgtattgacg 1980  
ccgggcaaga gcaactcggc cgccgcatac actattctca gaatgacttg gttgagtact 2040  
caccagtcac agaaaagcat cttacggatg gcatgacagt aagagaatta tgcagtgtctg 2100  
ccataacat gagtgataac actgcggcca acttacttct gacaacgatc ggaggaccga 2160  
aggagctaac cgcttttttg cacaacatgg gggatcatgt aactcgcctt gatcgttggg 2220  
aaccggagct gaatgaagcc ataccaaagc acgagcgtga caccacgatg cctgtagcaa 2280  
tggcaacaac gttgcgcaaa ctattaactg gcgaactact tactctagct tccoggcaac 2340  
aattaataga ctggatggag gcggataaag ttgcaggacc acttctgcgc tcggcccttc 2400  
cggttggtct gtttattgct gataaatctg gagccgggtga gcgtgggtct gcgggtatca 2460  
ttgcagcact ggggccagat ggtaagccct cccgtatcgt agttatctac acgacgggga 2520  
gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac agatcgctga gataggtgcc tcaactgatta 2580  
agcattggta actgtcagac caagtttact catatatact ttagattgat ttaaaacttc 2640

atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga tcctttttga taatctcatg accaaaatcc 2700  
cttaacgtga gttttcgttc cactgagcgt cagaccccggt agaaaagatc aaaggatcctt 2760  
cttgagatcc tttttttctg cgcgtaatat gctgcttgca aacaaaaaaa ccaccgctac 2820  
cagcgggtggt ttgtttgccg gatcaagagc taccaactct ttttcgaag gtaactggct 2880  
tcagcagagc gcagatacca aatactgttc ttctagtgtg gccgtagtta ggccaccact 2940  
tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg 3000  
ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg ggttggactc aagacgatag ttaccggata 3060  
aggcgcagcg gtcgggctga acgggggggtt cgtgcacaca gccagcttg gagcgaacga 3120  
cctacaccga actgagatac ctacagcgtg agctatgaga aagcgccacg cttcccgaag 3180  
ggagaaaggc ggacaggtat ccggttaagcg gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg 3240  
agcttccagg gggaaacgcc tggatatctt atagtctgt cgggtttcgc cacctctgac 3300  
ttgagcgtcg atttttgtga tgctcgtcag gggggcggag cctatggaaa aacgccagca 3360  
acgcggcctt ttacgggttc ctggcctttt gctggccttt tgctcacatg ttctttcctg 3420  
cgttatcccc tgattctgtg gataaccgta ttaccgcctt tgagttagct gataccgctc 3480  
gccgcagccg aacgaccgag cgcagcaggt cagttagcga ggaagcggaa gagcgcccaa 3540  
tacgcaaacc gcctctcccc gcgcgttggc cgattcatta atgcagctgg cacgactaga 3600  
gtcccgtga ggcggcgtag caggtcagcc gcccagcgg tggtcaccaa ccgggggtgga 3660  
acggcgccgg tatcgggtgt gtccgtggcg ctcatccaa cctccgtgtg tttgtgcagg 3720  
tttcgcgtgt tgcagtcctt cgcaccggca cccgcagcga ggggctcacg ggtgccggtg 3780  
ggtcgactag ttcagtgtat gtgatggtga tgctcagag atctaagctt ggatccgcgg 3840  
ccgctacgta gaattcccat ggcgtgatgg tgatggtgat ggcccatatg tatactcctt 3900  
tcttaaagtt aaacaaaatt atttctagac gccgtccatt atacctctc acgtgacgtg 3960  
aggtgcaagc ccggacgttc cgcgtgccac gccgtgagcc gccgcgtgcc gtcggctccc 4020  
tcagcccggg cggccgtggg agcccgcctc gatatgtaca cccgagaagc tcccagcgtc 4080  
ctcctgggcc gcgatactcg accaccacgc acgcacaccg cactaacgat tcggccggcg 4140  
ctcgattcgg ccggcgctcg attcggccgg cgctcgattc ggccggcgct cgattcggcc 4200  
ggcgctcgat tcggccgagc agaagagtga acaaccaccg accacgcttc cgctctgcgc 4260  
gccgtacccg acctacctcc cgcagctcga agcagctccc gggagtaccg ccgtactcac 4320  
ccgcctgtgc tcaccatcca ccgacgcaa gcccaaccg agcacacctc ttgcaccaag 4380  
gtgccgaccg tggctttccg ctgcgagggt tccagaagaa atcgaacgat ccagcgcggc 4440

aaggttcaaa aagcaggggt tgggtggggag gaggttttgg ggggtgtcgc cgggatacct 4500  
gatatggctt tgttttgcgt agtcgaataa ttttccatat agcctcggcg cgtcggactc 4560  
gaatagttga tgtgggcggg cacagttgcc ccatgaaatc cgcaacgggg ggctgtctga 4620  
gcgatcggca atgggcggat gcggtgttgc ttccgcaccg gccgttcgcg acgaacaacc 4680  
tccaacgagg tcagtaccgg atgagccgcg acgacgcatt ggcaatgcgg tacgtcgagc 4740  
attcaccgca cgcgttgctc ggatctatcg tcatcgactg cgatcacgtt gacgccgcga 4800  
tgcgcgcatt cgagcaacca tccgaccatc cggcgccgaa ctgggtcgca caatcgccgt 4860  
ccggccgcgc acacatcgga tgggtggctcg gccccacca cgtgtgccgc accgacagcg 4920  
cccgactgac gccactgcgc tacgccacc gcacgaaac cggcctcaag atcagcgtcg 4980  
gcggcgatth cgcgtatggc gggcaactga caaaaaacc gattcacccc gattgggaga 5040  
cgatctacgg cccggccacc ccgtacacat tgcggcagct ggccaccatc cacacacccc 5100  
ggcagatgcc gcgtcggccc gatcgggccc tgggcctggg ccgcaacgtc accatgttcg 5160  
acgccacccg gcgatgggca taccgcagt ggtggcaaca ccgaaacgga accggccgcg 5220  
actgggacca tctcgtcctg cagcactgcc acgccgtcaa caccgagttc acgacaccac 5280  
tgccgttcac cgaagtacgc gccaccgcgc aatccatctc caaatggatc tggcgcaatt 5340  
tcaccgaaga acagtaccga gcccgacaag cgcattctcg tcaaaaaggc ggcaaggcaa 5400  
cgacactcgc caaacaagaa gccgtccgaa acaatgcaag aaagtacgac gaacatacga 5460  
tgcgagaggc gattatctga tgggcggagc caaaaatccg gtgcgccgaa agatgacggc 5520  
agcagcagca gccgaaaaat tcggtgcctc cactcgcaca atccaacgct tgtttgctga 5580  
gccgcgtgac gattacctcg gccgtgcgaa agctcgccgt gacaaagctg tcgagctgcg 5640  
gaagcagggg ttgaagtacc gggaaatcgc cgaagcgatg gaactctcga ccgggatcgt 5700  
cggccgatta ctgcacgacg cccgcaggca cggcgagatt tcagcggagg atctgtcggc 5760  
gtaaccaagt cagcgggttg tcgggttcog gccggcgctc ggcaactcgga ccggccggcg 5820  
gatggtgttc tgcctctggc gcagcgtcag ctaccgccga aggcctgtca tcgaccggct 5880  
tcgactgaag tatgagcaac gtcacagcct gtgattggat gatccgctca cgtcgcaccg 5940  
ctacctgttc agctgccgcc cgctgggcat gagcaacggc caactctc 5988

&lt;210&gt; 101

&lt;211&gt; 6058

&lt;212&gt; DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: vector pNit-RT1

<400> 101

gttaactaga gtaacgggct actccgttta acggaccccg ttctcacgct ttaggcttga 60  
ccccggagcc tgcattggggc attccgccgt gaaccgggtg gaatgcccc ggcacccggg 120  
ctttccagca aagatcacct ggccgccgat agtaaggcgt acagaaccac tccacaggag 180  
gaccgtcgag atgaaatcta acaatgcgct catcgtcatc ctccggcaccg tcaccctgga 240  
tgctgtaggc ataggcttgg ttatgccggt actgccgggc ctcttgccggg atatcgtcca 300  
ttccgacagc atcgccagtc actatggcgt gctgctagcg ctatatgcgt tgatgcaatt 360  
tctatgcgca ccgcttctcg gagcactgtc cgaccgcttt ggccgccgcc cagtcctgct 420  
cgcttcgcta cttggagcca ctatcgacta cgcgatcatg gcgaccacac ccgtcctgtg 480  
gattctctac gccggacgca tcgtggccgg catcacgggc gccacagggtg cggttgctgg 540  
cgcctatatc gccgacatca ccgatgggga agatcgggct cgccacttcg ggctcatgag 600  
cgcttgcttc ggctgggta tgggtggcagg ccccgctggc gggggactgt tgggcgccat 660  
ctccttgcat gcaccattcc ttgcggcggc ggtgctcaac ggctcaacc tactactggg 720  
ctgcttccta atgcaggagt cgcataaggg agagcgtcgt ccgatgccct tgagagcctt 780  
caaccagtc agctccttcc ggtgggcgcg gggcatgact atcgtcgccg cacttatgac 840  
tgtcttcttt atcatgcaac tcgtaggaca ggtgccggca gcgctctggg tcattttcgg 900  
cgaggaccgc tttcgttga gcgcgacgat gatcggcctg tcgcttgccg tattcggaat 960  
cttgccagcc ctccgtcaag ccttcgtcac tgggtccgcc accaaacgtt tcggcgagaa 1020  
gcaggccatt atcgccggca tggcgggcca cgcgctgggc tacgtcttgc tggcgctcgc 1080  
gacgcgaggc tggatggcct tccccattat gattcttctc gcttcggcg gcacgggat 1140  
gcccgcgttg caggccatgc tgtccaggca ggtagatgac gaccatcagg gacagcttca 1200  
aggatcgctc gcggctctta ccagcctaac ttcgatcatt ggaccgctga tcgtcacggc 1260  
gatttatgcc gcctcggcga gcacatggaa cgggttgcca tggattgtag gcgccgccct 1320  
ataccttgtc tgcctccccg cgttgcgctc cgggtgatgg agccgggcca cctcgacctg 1380  
aatggaagcc ggccggcacct cgctaacgga ttcaccactc caagaattgg agccaatcaa 1440  
ttcttgccga gaactgtgaa tgcgcaaacc aacccttggc agaacatatc catcgcgtcc 1500

gccatctcca gcagccgcac gcggcgcatc tcgggcagcg ttgggtcctg gccacgggtg 1560  
cgcatgatcg tgctcctgtc gttgaggtac cgagctcgtc aggtggcact tttcggggaa 1620  
atgtgcgcgg aaccctatt tgtttatatt tctaaataca ttcaaataatg tatccgetca 1680  
tgagacaata accctgataa atgcttcaat aatattgaaa aaggaagagt atgagtattc 1740  
aacatttccg tgtcgccctt attccctttt ttgcggcatt ttgccttcct gtttttgctc 1800  
accagaaac gctggtgaaa gtaaaagatg ctgaagatca gttgggtgca cgagtgggtt 1860  
acatcgaact ggatctcaac agcggtaaga tccttgagag ttttcgcccc gaagaacgtt 1920  
ttccaatgat gagcactttt aaagtctctg tatgtggcgc ggtattatcc cgtattgacg 1980  
ccgggcaaga gcaactcggg cgccgcatac actattctca gaatgacttg gttgagtact 2040  
caccagtcac agaaaagcat cttacggatg gcatgacagt aagagaatta tgcagtgtctg 2100  
ccataacat gagtgataac actgcggcca acttacttct gacaacgatc ggaggaccga 2160  
aggagctaac cgcttttttg cacaacatgg gggatcatgt aactcgcctt gatcgttggg 2220  
aaccggagct gaatgaagcc ataccaaacg acgagcgtga caccacgatg cctgtagcaa 2280  
tggaacaac gttgcgcaaa ctattaactg gcgaactact tactctagct tccggcaac 2340  
aattaataga ctggatggag gcggataaag ttgcaggacc acttctgcgc tcggcccttc 2400  
cggctggctg gtttattgct gataaatctg gagccggtga gcgtgggtct cgcggtatca 2460  
ttgcagcact ggggccagat ggtaagccct cccgtatcgt agttatctac acgacgggga 2520  
gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac agatcgctga gataggtgcc tcttgatta 2580  
agcattggta actgtcagac caagtttact catatatact ttagattgat ttaaaacttc 2640  
atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga tcctttttga taatctcatg accaaaatcc 2700  
cttaacgtga gttttcgctt cactgagcgt cagaccccgat agaaaagatc aaaggatctt 2760  
cttgagatcc tttttttctg cgcgtaatct gctgcttgca aacaaaaaaaa ccaccgctac 2820  
cagcgggtgt ttgtttgccg gatcaagagc taccaactct ttttcgaag gtaactggct 2880  
tcagcagagc gcagatacca aatactgttc ttctagtgtg gccgtagtta ggccaccact 2940  
tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg 3000  
ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg ggttggtgactc aagacgatag ttaccggata 3060  
aggcgcagcg gtcgggctga acgggggggt cgtgcacaca gccagcttg gagcgaacga 3120  
cctacaccga actgagatac ctacagcgtg agctatgaga aagcgccacg cttcccgaag 3180  
ggagaaaggc ggacaggtat ccggtaagcg gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg 3240  
agcttccagg gggaaacgcc tggatatctt atagtcctgt cgggtttcgc cacctctgac 3300

ttgagcgtcg atttttgtga tgctcgtcag gggggcggag cctatggaaa aacgccagca 3360  
acgcggcctt tttacggttc ctggcctttt gctggccttt tgctcacatg ttctttcctg 3420  
cgttatcccc tgattctgtg gataaccgta ttaccgcctt tgagtgaagt gataccgctc 3480  
gccgcagccg aacgaccgag cgcagcgagt cagtgaagca ggaagcggaa gagcgcccaa 3540  
tacgcaaacc gcctctcccc ggcggttggc cgattcatta atgcagctgg cagcactaga 3600  
gtcccgtga ggcggcgtag caggtcagcc gcccagcgg tggtcaccaa ccgggggtga 3660  
acggcgccgg tatcgggtgt gtccgtggcg ctcatccaa cctccgtgtg tttgtgcagg 3720  
tttcgctgtg tgcagtcctt cgcaccggca cccgcagcga ggggctcacg ggtgccggtg 3780  
ggtcgactag ttcagtgatg gtgatggtga tgctcagag atctaagctt ggatccgagg 3840  
ccgctacgta gaattcccat atggtgatgg tgatggtggc ccatgggata tctccttctt 3900  
aaagttaaac aaaattattt ctagacgccg tcattatac ctctcacgt gacgtgaggt 3960  
gcaagcccgg acgttcgcg tgccacgccg tgagccgccg cgtgccgtcg gctccctcag 4020  
cccgggcggc cgtgggagcc cgcctcgata tgtacaagca tggggactcg ccgcggacta 4080  
gcggcttccc gacacgccgt actgaccagc agatcagcga taaacgctgt ttctgctggt 4140  
taagtggata aaaaccaa atcagatga cctcgaagtg gaggatccga gctgaactag 4200  
ctggatttac tccgaaaata cgagcggcga cgaagggtgt tggaccacc tgccgccgcc 4260  
ttcgaggctc ctacttgact aggacccgc tcgttatgac cagcgtagt gctgaacacc 4320  
tttcggcaa agaccggccc cctgtcctcg tgctgtccga taagcgcggc atccggcacg 4380  
aacttcgacc caaacttcaa caaatcacca cgtcagaaac ttttaatgcg tgcggccggc 4440  
cgatttcggc cgtgaacggt gtgaccatcg tcaacgggtc caaagggttc ggatttggag 4500  
gccttcgctc ctgcggaaag ggctggatct gcccctgctg tgcgggaaaa gtcggcgcac 4560  
atcgagcaga cgaaatttct caagttgttg ctcatcaact cgggactgga tctgttgca 4620  
tggtgaccat gaccatgcgc cataccgtg ggcagcgttt gcatgatttg tggactggac 4680  
tttcggcagc ctggaaagct gcgaccaatg gccgccgatg gcgtaccgaa cgtgaaatgt 4740  
acggctgcga cggatacgtg cgagctgttg aaatcactca cggaaaaaac ggttggcacg 4800  
ttcacgtcca cgtctactc atgttcagcg gtgacgtgag tgagaacatc ctggaatcct 4860  
tctcgatgc gatgttcgat cgggtggacct ccaaactcgt gtctctggga tttgctgcgc 4920  
cactacgtaa ttcaggtgga ctgcacgtaa gaaagatttg tggagaagct gaccaagttc 4980  
tcgtgcata cctgacgaaa attgcatccg gggtcggcat ggaagtcggc agtggcgacg 5040  
gaaaaagtgg tcggcacggc aaccgtgcac cttgggaaat cgcggttgat gcagtcggag 5100

gagatccaca agcgttggaa ctctggcgcg agtttgagtt cggttcgatg ggacgccgag 5160  
caatcgcatg gtctcgtgga ctgcgcgccc gagctgggtct tggcgtagaa ctacaggatg 5220  
ctcagattgt cgaacaggaa gaatctgccc cggtcattgt tgcgatcatt ccggctcggg 5280  
cctggatgat gattcggaac tgtgcgcctt acgttttcgg agagatcctt ggactcgtgg 5340  
aagcggggcg gacctgggaa aaccttcgtg accacttgca ttatcgattg cctgcagcgg 5400  
atgtgcggcc tccgataata tcgattcgta agtgaaatgt cttgggtgtgc aacaactttc 5460  
actcgtatga accacacttg agggcatccc cccgatactt gccgctttga agctgggtgt 5520  
ctctctgtca gggctgcgat agcaccgcgt agcggcttgg ccttgacaga gagacggcct 5580  
gtttcatggt tgggtctcggg gggctgaccg ggcagataga aaaaggccgg ccgatttggc 5640  
tgccgactat ttttgcaggt aaacccatct catgagcatc aatgaacgtc ccgttggtat 5700  
cgcagcgaat gcagcttcgg tagacgtcga tggcgttgtg atgggtgtgt atctctcgct 5760  
ttatgggcaa gaaatcacgc tagatcgaga tgatgcgttc ctactcctcg atcgacttca 5820  
ggacgcgttg cgacctcaag ccaactaaga accctccaga tggctctaac gaggcgcaaa 5880  
ctcgtccttg ggcctgcggg cggagcaccg aagcgcgagc gaagcggagc gcgtaggttg 5940  
gggagcctgc gggcagcggc ggcggagccg ccgccttggt aataggtgat catcggggcc 6000  
atagcaggtc agaggatggt ttacgatga ctcatgctca ccacgccaag tactgatg 6058

<210> 102

<211> 6062

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:vector pNit-RT2

<400> 102

gttaactaga gtaacgggct actccgttta acggaccccg ttctcacgct ttaggcttga 60  
ccccggagcc tgcattggggc attccgccgt gaaccgggtg gaatgcccc ggcacccggg 120  
ctttcagca aagatcacct ggcgccgatg agtaaggcgt acagaaccac tccacaggag 180  
gaccgtcgag atgaaatcta acaatgcgct catcgctcat ctcggcaccg tcaccctgga 240



tgctgtaggc ataggcttgg ttatgccggt actgccgggc ctcttgcggg atatcgtcca 300  
ttccgacagc atcgccagtc actatggcgt gctgctagcg ctatatgctg tgatgcaatt 360  
tctatgcgca cccgttctcg gagcactgtc cgaccgcttt ggccgcccgc cagtcctgct 420  
cgcttcgcta cttggagcca ctatcgacta cgcgatcatg gcgaccacac ccgtcctgtg 480  
gattctctac gccggacgca tcgtggccgg catcaccggc gccacaggtg cggttgctgg 540  
cgcctatatc gccgacatca ccgatgggga agatcgggct cgccacttcg ggctcatgag 600  
cgcttgtttc ggctgaggta tggtagcagg ccccgtaggc gggggactgt tgggagccat 660  
ctccttgcat gcaccattcc ttgaggcggc ggtgctcaac ggcccaacc tactactggg 720  
ctgcttccta atgcaggagt cgcataaggg agagcgtcgt ccgatgccct tgagagcctt 780  
caaccagtc agctccttcc ggtgggagcg gggcatgact atcgtcgccg cacttatgac 840  
tgtcttcttt atcatgcaac tcgtaggaca ggtgccggca gcgctctggg tcattttcgg 900  
cgaggaccgc tttcgctgga gcgcgacgat gatcggcctg tcgcttgagg tattcggaat 960  
cttgcaagcc ctgctcaag ccttcgtcac tggtagcgcc accaaacgtt tcggcgagaa 1020  
gcaggccatt atcgccggca tggcgggcga cgcgctgggc tacgtcttgc tggcgttcgc 1080  
gacgcgaggc tggatggcct tccccattat gattcttctc gcttcggcg gcacgggat 1140  
gcccgcgttg caggccatgc tgtccaggca ggtagatgac gaccatcagg gacagcttca 1200  
aggatcgctc ggggctctta ccagcctaac ttcgatcatt ggaccgctga tcgtcacggc 1260  
gatttatgcc gcctcggcga gcacatggaa cgggttgga tggattgtag gcgcgcct 1320  
ataccttgct tgcctccccg cgttgctcgc cggtagcatg agccgggcca cctcgacctg 1380  
aatggaagcc ggcggcacct cgctaacgga ttcaccactc caagaattgg agccaatcaa 1440  
ttcttgcgga gaactgtgaa tgcgcaaac aacccttggc agaacatatc catcgctcc 1500  
gccatctcca gcagccgcac gcggcgcatc tcgggcagcg ttgggtcctg gccacgggtg 1560  
cgcatgatcg tgctcctgtc gttgaggtag cgagctcgtc aggtggcact ttcggggaa 1620  
atgtgcgagg aaccctatt tgtttatatt tctaaataca ttcaaatac tatccgctca 1680  
tgagacaata accctgataa atgcttcaat aatattgaaa aaggaagagt atgagtattc 1740  
aacatttcg tgtagcctt attccctttt ttgaggcatt ttgccttcct gtttttgc 1800  
accagaaac gctggtagaa gtaaaagatg ctgaagatca gttgggtgca cgagtgggtt 1860  
acatcgaact ggatctcaac agcggtaaga tccttgagag ttttcgcccc gaagaacgtt 1920  
ttccatgat gagcactttt aaagttctgc tatgtggcgc ggtattatcc cgtattgacg 1980  
ccgggcaaga gcaactcggc cgccgcatac actattctca gaatgacttg gttgagtact 2040

caccagtcac agaaaagcat cttacggatg gcatgacagt aagagaatta tgcagtgtg 2100  
ccataaccat gagtgataac actgcgcca acttacttct gacaacgatc ggaggaccga 2160  
aggagctaac cgcttttttg cacaacatgg gggatcatgt aactcgcctt gatcgttggg 2220  
aaccggagct gaatgaagcc ataccaaacg acgagcgtga caccacgatg cctgtagcaa 2280  
tggcaacaac gttgcgcaaa ctattaactg gcgaactact tactctagct tcccggcaac 2340  
aattaataga ctggatggag gcggataaag ttgcaggacc acttctgcgc tcggcccttc 2400  
cggctggctg gtttatgtg gataaatctg gagccggatga gcgtgggtct cgcggtatca 2460  
ttgcagcact ggggccagat ggtaagccct cccgtatcgt agttatctac acgacgggga 2520  
gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac agatcgtga gatagggtgcc tcaactgatta 2580  
agcattggta actgtcagac caagtttact catatatact ttagattgat ttaaaacttc 2640  
atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga tcctttttga taatctcatg accaaaatcc 2700  
cttaacgtga gttttcgttc cactgagcgt cagaccccgt agaaaagatc aaaggatctt 2760  
cttgagatcc tttttttctg cgcgtaatct gctgcttgca aacaaaaaaa ccaccgtac 2820  
cagcgggtgt ttgtttgccc gatcaagagc taccaactct tttccgaag gtaactggct 2880  
tcagcagagc gcagatacca aatactgttc ttctagtgtg gccgtagtta ggccaccact 2940  
tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg 3000  
ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg ggttggaactc aagacgatag ttaccggata 3060  
aggcgcagcg gtcgggctga acggggggtt cgtgcacaca gccagcttg gagcgaacga 3120  
cctacaccga actgagatac ctacagcgtg agctatgaga aagcgccacg cttcccgaag 3180  
ggagaaaggc ggacaggatc ccggtaaagc gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg 3240  
agcttccagg gggaaacgcc tggatatctt atagtcctgt cgggtttcgc cacctctgac 3300  
ttgagcgtcg atttttgtga tgctcgtcag gggggcggag cctatggaaa aacgccagca 3360  
acgcggcctt tttacggttc ctggcctttt gctggccttt tgctcacatg ttctttcctg 3420  
cgttatcccc tgattctgtg gataaccgta ttaccgcctt tgagttagct gataccgctc 3480  
gccgcagccg aacgaccgag cgcagcagat cagttagcga ggaagcggaa gagcgcccaa 3540  
tacgcaaacc gcctctcccc gcgcgttggc cgattcatta atgcagctgg cacgactaga 3600  
gtcccgtga ggccgctag caggtcagcc gcccagcgg tggtcaccaa ccgggggtgga 3660  
acggcgccgg tatcgggtgt gtccgtggcg ctcatccaa cctccgtgtg tttgtgcagg 3720  
tttcgcgtgt tgcagtcct cgcaccggca cccgcagcga ggggctcacg ggtgccggtg 3780  
ggtcgactag ttcagtgtg gtgatggtga tgctcagag atctaagctt ggatccgcgg 3840

ccgctacgta gaattcccat ggcgtgatgg tgatgggtgat ggcccatatg tatatctcct 3900  
tcttaaagtt aaacaaaatt atttctagac gccgtccatt atacctcctc acgtgacgtg 3960  
aggtgcaagc ccggacgttc cgcgtgccac gccgtgagcc gccgcgtgcc gtcggctccc 4020  
tcagcccggg cggccgtggg agcccgccctc gatatgtaca agcatgggga ctgccgcgg 4080  
actagcggct tcccgacacg ccgtactgac cagcagatca gcgataaacg ctgtttctgc 4140  
tggttaagtg gataaaaacc aaataatcga tgaacctcga agtggagtat ccgagctgaa 4200  
ctagctggat ttactccgaa aatacgagcg gcgacgaagg gtgttgacc accctgccgc 4260  
cgccttcgag gtcctactt gactaggacc ccgtcgtta tgaccagcgt aagtgtgaa 4320  
cacctttccg gcaaagaccg gccccctgtc ctgctgtcgt ccgataagcg cggcatccgg 4380  
cacgaacttc gacccaaact tcaacaaatc accacgtcag aaacttttaa tgcgtgcggc 4440  
cggccgattt ccggcgtgaa cgggtgacc atcgtcaacg gtcccaaagg ttccggattt 4500  
ggaggccttc gtcctgcgg aaagggtg atctgccct gctgtgcggg aaaagtcggc 4560  
gcacatcgag cagacgaaat ttctcaagtt gttgctcatc aactcgggac tggatctgtt 4620  
gcgatgggta ccatgaccat gcgccatacc gctgggcagc gtttgcatga tttgtggact 4680  
ggactttcgg cagcctggaa agctgcgacc aatggccgcc gatggcgtac cgaacgtgaa 4740  
atgtacggct gcgacggata cgtacgagct gttgaaatca ctcacggaaa aaacggttg 4800  
cacgttcacg tccacgtctt actcatgttc agcggtgacg tgagtgagaa catcctcgaa 4860  
tccttctcgg atgcgatgtt cgatcgggtg acctccaaac tcgtgtctct gggatttgct 4920  
gcgccactac gtaattcagg tggactcgac gtaagaaaga ttggtggaga agctgaccaa 4980  
gttctcgtc catacctgac gaaaattgca tccggggctg gcatggaagt cggcagtggc 5040  
gacggaaaaa gtggtcggca cggcaaccgt gcaccttggg aaatcgccgt tgatgcagtc 5100  
ggaggagatc cacaagcgtt ggaactctgg cgcgagttt agttcggttc gatgggacgc 5160  
cgagcaatcg catggtctcg tggactgcgc gcccgagctg gtcttggcgt agaactcacg 5220  
gatgctcaga ttgtcgaaca ggaagaatct gcccggtca tggttgcgat cattccggct 5280  
cggctcctgga tgatgattcg gaactgtgcg ccttacgttt tcggagagat ccttggactc 5340  
gtggaagcgg gcgcgacctg ggaaaacctt cgtgaccact tgcattatcg attgcctgca 5400  
gcggatgtgc ggcctccgat aatatcgatt cgtaagtga atgtcttggt gtgcaacaac 5460  
tttcactcgt atgaaccaca cttgagggca tcccccgat acttgccgct ttgaagctgg 5520  
gtgtctctct gtcagggtcg cgatagcacc gcgtagcggc ttggccttga cagagagacg 5580  
gcctgtttca tggttggtct cggggggctg accgggcaga tagaaaaagg ccggccgatt 5640

tggctgccga ctatTTTTgc aggtaaaccc atctcatgag catcaatgaa cgtcccgttg 5700  
gtatcgcagc gaatgcagct tcggtagacg tcgatggcgt tgtgatgggt gtgtatctct 5760  
cgctttatgg gcaagaaatc acgctagatc gagatgatgc gttcctactc ctcgatcgac 5820  
ttcaggacgc gttgcgacct caagccaact aagaaccctc cagatgggtct aaacgaggcg 5880  
caaactcgct cctgggcctg cgggcggagc accgaagcgc gagcgaagcg gagcgcgtag 5940  
gtggggggagc ctgcgggcag cggcggcgga gccgccgcct tggtaatagg tgatcatcgg 6000  
ggccatagca ggtcagagga tgtttttacg atgactcatg ctcaccacgc caagtactga 6060  
tg 6062

<210> 103

<211> 6153

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:vector pNit-QC1

<400> 103

gttaacgcat ccgaaacctc caccaccactc acctagtccg acatccgtac cttggaaacc 60  
gacctgtatt ggcatttcag ttggacatcg accagtggcg ttgctagggt caagaccatg 120  
tccagcccga aggcgtccag actctagcca ccggaggtag tccgggtggcc acatcccgtc 180  
gcgcccgaac gtcacgctct tgtgtggcct tcccttggtt tttgcgatca gtggcacacc 240  
tctaccgtct gaatttcgag tctggcctcg gctgcgcaca tctcgactg tgacgctgtc 300  
aggtcacccg cttcgcggct accagttcct ttcatcgaat cgagcttccg gtgcgcgcgc 360  
gcagctccc tgaccatcct cagattttat ggagtctcgc agtgcctttc gctatctacg 420  
tcctcgggct tgctgtcttc gccagggca catccgagtt catgttgtcc ggactcatac 480  
cggacatggc ccgtgacctc ggggtttcgg tccccgccgc cggactcctc acctccgcct 540  
tcgcggtcgg gatgatcatc ggcgctccgt tgatggctat cgccagcatg cgggtggcccc 600  
ggcgacgcgc ccttctgaca ttcctcatca cgttcatgct ggtccacgtc atcggcgcgc 660  
tcaccagcag cttcgaggtc ttgctgggtca cacgcatcgt gggagccctc gccaatgccg 720

gattcttggc agtggccctg ggggcgggcga tggcgatggt gcccgccgac atgaaagggc 780  
gcgccacgtc cgtcctcctc ggcggtgtca cgatcgcatg tgtagccggt gttcccgggg 840  
gcgccttcct gggtgaaatg tggggctggc gtgcagcgtt ctgggctgtc gtcgtcatct 900  
ccgcccctgc agtggtagcg attatgttcg ccaccccggc cgagccgctt gcagagtcca 960  
caccgaatgc caagcgtgaa ctgtcctcac tgcgctcacg caagctccag ctcatgcttg 1020  
tcctcggggc gctgatcaac ggcgcaacgt tctgttcgtt cacgtacatg gcgcccacgc 1080  
tcaccgacat ctccggttcc gactcccgtt ggattccgtt gctgctgggg ctgttcgggc 1140  
tcggatcggt catcggtgtc agcgctggag gcaggctcgc cgacacccgg ccgttccaac 1200  
tgctcgctgt cgggtccgca gcaactgtga cgggatggat cgtcttcgct ctacaggcat 1260  
cccacccgcg ggtgacattg gtgatgctgt tcgtgcaggc cgctttgtcc ttcgcggtcg 1320  
gctcgacttt gatctcccag gtgctctacg ccgcccacgc ggcaccgacc ttgggtggat 1380  
cgttcgcgac ggccgcgttc aacgtcgggt ctgcaactgg accggcgctc ggccgggttg 1440  
cgatcggcat gggctctgagc taccgcgccc cgctctggac gagcgccgcg ctggtgacac 1500  
tcgcgatcgt catcggcgca gccaccttgt ctctgtggcg gcgaccagcg tctgtccacg 1560  
aatctgtccc cgcctgacca gaaaccagga tctgtgagtg tggtagactg tctgtgcacg 1620  
ctcagcagtc accgcgcgct cgcgtcgtac cgagggccag cgccaacagg tgtgtggagc 1680  
tctgcccctg cctctttcac gcgaactcac tggtcagtgc ggcgatacgt gctcgggtgag 1740  
ttccactaca gcgaggtacc gagctcgtca ggtggcactt ttcggggaaa tgtgcgcgga 1800  
accctatatt gtttattttt ctaaatacat tcaaataatg atccgctcat gagacaataa 1860  
ccctgataaa tgcttcaata atattgaaaa aggaagagta tgagtattca acatttcctg 1920  
gtcgccctta ttcccttttt tgcggcattt tgccttcctg tttttgctca ccagaaaacg 1980  
ctggtgaaag taaaagatgc tgaagatcag ttgggtgcac gactgggtta catcgaactg 2040  
gatctcaaca gcggtaagat ccttgagagt tttcgccccg aagaacgttt tccaatgatg 2100  
agcactttta aagttctgct atgtggcgcg gtattatccc gtattgacgc cgggcaagag 2160  
caactcggtc gccgcataca ctattctcag aatgacttgg ttgagtactc accagtcaca 2220  
gaaaagcacc ttacggatgg catgacagta agagaattat gcagtgtctc cataaccatg 2280  
agtgataaca ctgcggccaa ctacttctg acaacgatcg gaggaccgaa ggagctaacc 2340  
gcttttttgc acaacatggg ggatcatgta actcgccttg atcgttggga accggagctg 2400  
aatgaagcca taccaaacga cgagcgtgac accacgatgc ctgtagcaat ggcaacaacg 2460  
ttgcgcaaac tattaactgg cgaactactt actctagctt cccggcaaca attaatagac 2520

tggatggagg cggataaagt tgcaggacca cttctgcgct cggcccttcc ggctggctgg 2580  
tttattgctg ataaatctgg agccggtgag cgtgggtctc gcggtatcat tgcagcactg 2640  
gggccagatg gtaagccctc ccgtatcgta gttatctaca cgacggggag tcaggcaact 2700  
atggatgaac gaaatagaca gatcgctgag atagggtgcct cactgattaa gcattggtaa 2760  
ctgtcagacc aagtttactc atatatactt tagattgatt taaaacttca tttttaattt 2820  
aaaaggatct aggtgaagat cctttttgat aatctcatga ccaaaatccc ttaacgtgag 2880  
ttttcgttcc actgagcgtc agaccccgta gaaaagatca aaggatcttc ttgagatcct 2940  
ttttttctgc gcgtaatctg ctgcttgcaa acaaaaaaac caccgctacc agcggtggtt 3000  
tgtttgccgg atcaagagct accaactctt tttccgaagg taactggctt cagcagagcg 3060  
cagatacca atactgttct tctagtgtag ccgtagttag gccaccactt caagaactct 3120  
gtagcaccgc ctacatacct cgctctgcta atcctgttac cagtggctgc tgccagtggc 3180  
gataagtcgt gtcttaccgg gttggactca agacgatagt taccggataa ggcgagcgg 3240  
tcgggctgaa cgggggggtc gtgcacacag ccagcttgg agcgaacgac ctacaccgaa 3300  
ctgagatacc tacagcgtga gctatgagaa agcgccacgc ttcccgaagg gagaaaggcg 3360  
gacaggtatc cggtaaaggc cagggtcgga acaggagagc gcacgaggga gcttccaggg 3420  
ggaaacgcct ggtatcttta tagtcctgtc gggtttcgcc acctctgact tgagcgtcga 3480  
tttttgtgat gctcgtcagg ggggcggagc ctatggaaaa acgccagcaa cgcgcccttt 3540  
ttacggttcc tggccttttg ctggcctttt gctcacatgt tctttcctgc gttatcccct 3600  
gattctgtgg ataaccgtat taccgccttt gagttagctg ataccgctcg ccgcagccga 3660  
acgaccgagc gcagcgagtc agtgagcgag gaagcggaag agcgcccaat acgcaaaccg 3720  
cctctccccg cgcgttggcc gattcattaa tgcagctggc acgactagag tccgctgag 3780  
gcggcgtagc aggtcagccg cccagcgggt ggtcaccaac cgggggtggaa cggcgccggt 3840  
atcgggtgtg tccgtggcgc tcattccaac ctccgtgtgt ttgtgcaggt ttcgctgtt 3900  
gcagtccctc gcaccggcac ccgcagcgag gggctcacgg gtgccggtgg gtcgactagt 3960  
tcagtgatgg tgatgggtgat gctcagagaa tctaagcttg gatccgcggc cgctacgtag 4020  
aattcccata tgggtgatgt gatgggtggc catggtatat ctcttctta aagttaaaca 4080  
aaattatttc tagacgccgt ccattatacc tcctcacgtg acgtgaggtg caagcccggg 4140  
cgttccgctg gccacgccgt gagccgccgc gtgccgtcgg ctccctcagc ccgggcccgc 4200  
gtgggagccc gcctcgatat gtacaccgga gaagctccca gcgtcctcct gggccgcgat 4260  
actcgaccac cagcagcga caccgcacta acgattcggc cggcgctcga ttcggccggc 4320

gctcgattcg gccggcgctc gattcggccg gcgctcgatt cggccggcgc tcgattcggc 4380  
cgagcagaag agtgaacaac caccgaccac gcttcgcgtc tgcgcgccgt acccgacctt 4440  
cctcccgcag ctccaagcag ctcccgggag taccgccgta ctcaccgcgc tgtgtctacc 4500  
atccaccgac gcaaagccca acccgagcac acctcttgca ccaagggtgcc gaccgtggct 4560  
ttccgctcgc agggttccag aagaaatcga acgatccagc gcggcaagggt tcaaaaagca 4620  
ggggttgggtg gggaggaggt tttgggggggt gtcgccggga tacctgatata ggctttgttt 4680  
tgcgtagtcg aataattttc catatagcct cggcgcgtcg gactcgaata gttgatgtgg 4740  
gcgggcacag ttgccccatg aaatccgcaa cggggggcgt gctgagcgat cggcaatggg 4800  
eggatgcggt gttgcttcgc caccggccgt tcgcgacgaa caacctcaa cgaggctcagt 4860  
accggatgag ccgcgacgac gcattggcaa tgcggtacgt cgagcattca ccgcacgcgt 4920  
tgctcggatc tatcgtcatc gactcgcgac acgttgacgc cgcgatgcgc gcattcgagc 4980  
aaccatccga ccatccggcg ccgaactggg tcgcacaatc gccgtccggc cgcgcacaca 5040  
tcggatgggtg gctcggcccc aaccacgtgt gccgcaccga cagcgcccga ctgacgccac 5100  
tgcgctacgc ccaccgcac gaaaccggcc tcaagatcag cgtcggcggc gatttcgcgt 5160  
atggcgggca actgaccaa aaccgattc acccgattg ggagacgac tacggcccgg 5220  
ccaccccgta cacattgcgg cagctggcca ccatccacac accccggcag atgccgcgtc 5280  
ggcccgatcg ggccgtgggc ctgggcccga acgtcacat gttcgacgcc acccgcgat 5340  
gggcataccc gcagtgggtg caacaccgaa acggaaccgg ccgcgactgg gaccatctcg 5400  
tcctgcagca ctgccacgcc gtcaacaccg agttcacgac accactgccg ttcaccgaag 5460  
tacgcgccac cgcgcaatcc atctccaaat ggatctggcg caatttcacc gaagaacagt 5520  
accgagcccg acaagcgcac ctccgtcaaa aaggcggcaa ggcaacgaca ctgcgcaaac 5580  
aagaagccgt ccgaaacaat gcaagaaagt acgacgaaca tacgatgcga gaggcgatta 5640  
tctgatgggc ggagccaaaa atccggtgcg ccgaaagatg acggcagcag cagcagccga 5700  
aaaattcgggt gcctccactc gcacaatcca acgcttggtt gctgagccgc gtgacgatta 5760  
cctcggccgt gcgaaagctc gccgtgacaa agctgtcgag ctgcggaagc aggggttgaa 5820  
gtaccgggaa atcgccgaag cgatggaact ctcgaccggg atcgtcggcc gattactgca 5880  
cgacgcccgc aggcacggcg agatttcagc ggaggatctg tcggcgtaac caagtcagcg 5940  
ggttgtcggg ttccggccgg cgctcggcac tcggaccggc cggcggatgg tgttctgcct 6000  
ctggcgcagc gtcagctacc gccgaaggcc tgtcatcgac cggcttcgac tgaagtatga 6060  
gcaacgtcac agcctgtgat tggatgatcc gctcacgctc gaccgctacc tgttcagctg 6120

ccgcccgtg ggcattgagca acggccaact etc

6153

<210> 104

<211> 6157

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:vector pNit-QC2

<400> 104

gttaacgcat ccgaaacctc caccacctc acctagtccg acatccgtac cttggaaacc 60  
gacctgtatt ggcatttcag ttggacatcg accagtggcg ttgctagggt caagaccatg 120  
tccagcccga aggcgtccag actctagcca ccggaggtag tccggtggcc acatcccgtc 180  
gcgcccgaac gtcacgtctt tgtgtggcct tcccttgttg tttgcgatca gtggcacacc 240  
tctaccgtct gaatttcgag tctggcctcg gctgcgcaca tctcgactg tgacgtgtc 300  
aggtcacccg cttcgcggct accagttcct ttcacgaat cgagcttcg gtgccgccgc 360  
gcagcctccc tgaccatcct cagattttat ggagtctcgc agtgcctttc gctatctacg 420  
tcctcgggct tgctgtcttc gccaggga catccgagtt catgttgctc ggactcatac 480  
cggacatggc ccgtgacctc ggggtttcgg tccccgccgc cggactcctc acctccgcct 540  
tcgcggtcgg gatgatcatc ggcgctccgt tgatggctat cgccagcatg cgggtggccc 600  
ggcgacgcgc cttctgaca ttcctcatca cgttcatgct ggtccacgtc atcggcgcgc 660  
tcaccagcag cttcgaggtc ttgctgggtc cacgcacgtg gggagccctc gccaatgccg 720  
gattcttggc agtggccctg ggggcggcga tggcgatggt gcccgcgcac atgaaagggc 780  
gcgccacgtc cgtcctcctc ggcggtgtca cgatcgcatg ttagccgggt gttcccgggg 840  
gcgccttcct ggggtgaaat tggggctggc gtgcagcgtt ctgggctgtc gtcgtcatct 900  
ccgcccctgc agtgggtggcg attatgttcg ccaccccggc cgagccgctt gcagagtcca 960  
caccgaatgc caagcgtgaa ctgtcctcac tgcgctcac caagctccag ctcatgcttg 1020  
tcctcggggc gctgatcaac ggcgcaacgt tctgttcgtt cacgtacatg gcgcccacgc 1080  
tcaccgacat ctccggtttc gactcccgtt ggattccgtt gctgctgggg ctgttcgggc 1140



tccgcatcgtt catcgggtgtc agcgtcggag gcaggctcgc cgacaccggt ccgttccaac 1200  
tgctcgtgt cgggtccgca gactgttga cgggatggat cgtcttcgct ctcacggcat 1260  
cccaccccg cgtgacattg gtgatgctgt tcgtgcaggg cgctttgtcc ttcgcggctc 1320  
gctcgacttt gatctcccag gtgctctacg ccgccgacgc ggcaccgacc ttgggtggat 1380  
cgttcgcgac ggccgcgttc aacgtcgggt ctgcactggg accggcgctc ggccgggttg 1440  
cgatcggcat ggggtctgagc taccgcgcc cgctctggac gagcgccgcg ctggtgacac 1500  
tcgcgatcgt catcggcgca gccacctgt ctctgtggcg gcgaccagcg tctgtccacg 1560  
aatctgtccc cgcctgacca gaaaccagga tctgtgagtg tgggtactga tctgtgcacg 1620  
ctcagcagtc accgcgcgct cgcgtcgtac cgagggccag cgccaacagg tgtgtggagc 1680  
tctgcccctg cctctttcac gcgaactcac tgttcagtgc ggcgatacgt gctcgggtgag 1740  
ttccactaca gcgaggtacc gagctcgtca ggtggcactt ttcggggaaa tgtgcgcgga 1800  
accctatatt gtttattttt ctaaatacat tcaaatatgt atccgctcat gagacaataa 1860  
ccctgataaa tgcttcaata atattgaaaa aggaagagta tgagtattca acatttcctg 1920  
gtcgccctta ttcccttttt tgcggcattt tgccttctcg tttttgctca ccagaaaacg 1980  
ctggtgaaag taaaagatgc tgaagatcag ttgggtgcac gagtgggtta catcgaactg 2040  
gatctcaaca gcggtgaagat ccttgagagt ttcgccccg aagaacgttt tccaatgatg 2100  
agcactttta aagttctgct atgtggcgcg gtattatccc gtattgacgc cgggcaagag 2160  
caactcggtc gccgcataca ctattctcag aatgacttgg ttgagtactc accagtcaca 2220  
gaaaagcatc ttacggatgg catgacagta agagaattat gcagtgtcgc cataaccatg 2280  
agtataaca ctgcggccaa cttaactctg acaacgatcg gaggaccgaa ggagctaacc 2340  
gcttttttgc acaacatggg ggatcatgta actcgccttg atcgttggga accggagctg 2400  
aatgaagcca taccaaacga cgagcgtgac accacgatgc ctgtagcaat ggcaacaacg 2460  
ttgcgcaaac tattaactgg cgaactactt actctagctt cccggcaaca attaatagac 2520  
tggtatggagg cggataaagt tgcaggacca cttctgcgct cggcccttcc ggctggctgg 2580  
tttattgctg ataaatctgg agccggtgag cgtgggtctc gcggtatcat tgcagcactg 2640  
gggccagatg gtaagccctc ccgtatcgta gttatctaca cgacggggag tcaggcaact 2700  
atggatgaac gaaatagaca gatcgtgag ataggtgcct cactgattaa gcatttgtaa 2760  
ctgtcagacc aagtttactc atatatactt tagattgatt taaaacttca tttttaattt 2820  
aaaaggatct aggtgaagat cctttttgat aatctcatga ccaaaatccc ttaacgtgag 2880  
tttcgttcc actgagcgtc agaccccgta gaaaagatca aaggatcttc ttgagatcct 2940

ttttttctgc gcgtaatctg ctgcttgcaa acaaaaaaac caccgctacc agcgggtggtt 3000  
tgtttgccgg atcaagagct accaactctt tttccgaagg taactggctt cagcagagcg 3060  
cagataccaa atactgttct tctagtgtag ccgtagttag gccaccactt caagaactct 3120  
gtagcaccgc ctacatacct cgctctgcta atcctgttac cagtggctgc tgccagtggc 3180  
gataagtcgt gtcttaccgg gttggactca agacgatagt taccggataa ggcgagcg 3240  
tcgggctgaa cgggggggtt gtgcacacag ccagcttg agcgaacgac ctacaccgaa 3300  
ctgagatacc tacagcgtga gctatgagaa agcgccacgc ttcccgaagg gagaaaggcg 3360  
gacaggtatc cggtaagcgg cagggtcgga acaggagagc gcacgaggga gcttccaggg 3420  
ggaaacgcct ggtatcttta tagtctgtc gggtttcgcc acctctgact tgagcgtcga 3480  
tttttgatg gctcgtcagg gggcgaggc ctatggaaaa acgccagcaa cgcggccttt 3540  
ttacggttcc tggccttttg ctggcctttt gtcacatgt tctttcctgc gttatcccct 3600  
gattctgtgg ataaccgtat taccgccttt gagtgaactg ataccgctcg ccgcagccga 3660  
acgaccgagc gcagcgagtc agtgagcgag gaagcggaag agcgccaat acgcaaaccg 3720  
cctctccccg cgcgttggcc gattcattaa tgcagctggc acgactagag tcccgtgag 3780  
gcgcgtagc aggtcagccg cccagcggg ggtcaccaac cggggtggaa cggcgccggg 3840  
atcgggtgtg tccgtggcgc tcattccaac ctccgtgtgt ttgtgcagg ttcgcgtgtt 3900  
gcagtcctc gcaccggcac ccgcagcgag gggctcacgg gtgccgggtg gtcgactagt 3960  
tcagtgatgg tgatgggtgat gctcgagaga tctaagcttg gatccgcggc cgctacgtag 4020  
aattcccatg gcgtgatggt gatgggtgat gcccatatgt atatctcctt cttaaagtta 4080  
aacaaaatta tttctagacg ccgtccatta tacctcctca cgtgacgtga ggtgcaagcc 4140  
cggacgttcc gcgtgccacg ccgtgagccg ccgcgtgccg tcggctccct cagcccgggc 4200  
ggccgtggga gcccgcctcg atatgtacac ccgagaagct ccagcgtcc tcctgggccg 4260  
cgatactcga ccaccacgca cgcacaccgc actaacgatt cggccggcgc tcgattcggc 4320  
cggcgctcga ttcggccggc gctcgattcg gccggcgctc gattcggccg gcgctcgatt 4380  
cggccgagca gaagagtga caaccaccga ccacgcttcc gctctgcgcg ccgtaccoga 4440  
cctacctccc gcagctcgaa gcagctcccg ggagtaccgc cgtactcacc cgctgtgct 4500  
caccatccac cgacgcaaag cccaaccga gcacacctt tgcaccaagg tgccgaccgt 4560  
ggctttccgc tcgcagggtt ccagaagaaa tcgaacgatc cagcgcgga aggttcaaaa 4620  
agcaggggtt ggtggggagg aggttttggg ggggtgtgcc gggatacctg atatggcttt 4680  
gttttgcgta gtcgaataat tttccatata gcctcggcgc gtcggactcg aatagttgat 4740

```

gtgggcgggc acagttgccc catgaaatcc gcaacggggg gcgtgctgag cgatcggcaa 4800
tgggcgggatg cggtgttgct tccgcaccgg ccgttcgcga cgaacaacct ccaacgaggt 4860
cagtaccgga tgagccgcga cgacgcattg gcaatgcggt acgtcgagca ttcaccgcac 4920
gcgttgctcg gatctatcgt catcgactgc gatcacgttg acgccgcgat gcgcgcattc 4980
gagcaaccat ccgaccatcc ggccgccgaac tgggtcgcac aatcgccgtc cggccgcgca 5040
cacatcggat ggtggctcgg ccccaaccac gtgtgccga ccgacagcgc ccgactgacg 5100
ccactgcgct acgcccaccg catcgaaacc ggccctcaaga tcagcgtcgg cggcgatttc 5160
gcgtatggcg ggcaactgac caaaaacccg attcaccgac attgggagac gatctacggc 5220
ccggccaccc cgtacacatt gcggcagctg gccaccatcc acacaccccg gcagatgccg 5280
cgtcggcccg atcgggcccgt gggcctgggc cgcaacgtca ccatgttcga cgccaccg 5340
cgatgggcat acccgagtg gtggcaacac cgaaacggaa ccggccgcga ctgggacct 5400
ctcgtcctgc agcactgcca cgccgtcaac accgagttca cgacaccact gccgttcacc 5460
gaagtacgcg ccaccgcgca atccatctcc aaatggatct ggcgcaattt caccgaagaa 5520
cagtaccgag ccgcacaagc gcatctcggg caaaaaggcg gcaaggcaac gacactcgcc 5580
aaacaagaag ccgtccgaaa caatgcaaga aagtacgacg aacatacgat gcgagaggcg 5640
attatctgat gggcggagcc aaaaatccgg tgcgccgaaa gatgacggca gcagcagcag 5700
ccgaaaaatt cggtgcctcc actcgcacaa tccaacgctt gtttgctgag ccgcgtgacg 5760
attacctcg ccgtgcgaaa gctcgccgtg acaaagctgt cgagctgcgg aagcaggggt 5820
tgaagtaccg ggaaatcgcc gaagcgatgg aactctcgac cgggatcgtc ggccgattac 5880
tgcacgacgc ccgcaggcac ggcgagattt cagcggagga tctgtcggcg taaccaagtc 5940
agcgggttgt cgggttccgg ccggcgctcg gcaactcggac cggccggcgg atggtgttct 6000
gcctctggcg cagcgtcagc taccgccgaa ggccgtgcat cgaccggctt cgactgaagt 6060
atgagcaacg tcacagcctg tgattggatg atccgctcac gctcgaccgc tacctgttca 6120
gctgccgccc gctgggcatg agcaacggcc aactctc 6157

```

&lt;210&gt; 105

&lt;211&gt; 6227

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:vector pNit-RC1

&lt;400&gt; 105

gttaacgcat ccgaaacctc caccacctc acctagtccg acatccgtac cttggaaacc 60  
gacctgtatt ggcatctcag ttggacatcg accagtggcg ttgctagggt caagaccatg 120  
tccagcccga aggcgtccag actctagcca ccggaggtag tccgggtggcc acatcccgtc 180  
gcgcccgaac gtcacgtctt tgtgtggcct tcccttggtt tttgcgatca gtggcacacc 240  
tctaccgtct gaatttcgag tctggcctcg gctgcgcaca tctcgactg tgacgtctgc 300  
aggtcaccgc cttcgcggct accagttcct ttcacgaat cgagcttcgc gtgccgcgc 360  
gcagcctccc tgaccatcct cagatcttat ggagtctgc agtgccttc gctatctacg 420  
tctcggggt tgctgtcttc gccaggga catccaggtt catgttgtcc ggactcatac 480  
cggacatggc ccgtgacctc ggggtttcgg tccccgcgc cggactcctc acctccgcct 540  
tcgcggtcgg gatgatcatc ggcgtccgt tgatggctat cgccagcatg cggtggtccc 600  
ggcgacgcgc cttctgaca ttcctcatca cgttcatgct ggtccacgtc atcggcggc 660  
tcaccagcag cttcagagtc ttgctggta cacgcatcgt gggagccctc gccaatgccg 720  
gattcttggc agtggccctg ggggcggcga tggcgatggt gcccgcgcac atgaaagggc 780  
gcgccacgtc cgtcctcctc ggcggtgtca cgatcgcatg ttagccggt gttccgggg 840  
gcgccttctt ggggtgaaatg tggggtcggc gtgcagcgtt ctgggctgtc gtcgtcatct 900  
ccgcccctgc agtgggtggc attatgttcg ccacccggc cgagccgctt gcagagtcca 960  
caccgaatgc caagcgtgaa ctgtcctcac tgcgtcacg caagctccag ctcagtctt 1020  
tcctcggggc gctgatcaac ggcgcaacgt tctgttcgtt cacgtacatg gcgccacgc 1080  
tcaccgacat ctccggttgc gactccggtt ggattccgtt gctgctgggg ctgttcgggc 1140  
tcggatcgtt catcgggtgc agcgtcggag gcaggctcgc cgacaccgc ccgttccaac 1200  
tgctcgtgt cgggtccgca gcaactgtga cgggatggat cgtcttcgt ctcacggcat 1260  
cccacccgc ggtgacattg gtgatgctgt tcgtgcaggg cgctttgtcc ttcgcggtcg 1320  
gctcgacttt gatctcccag gtgctctacg ccgccgacgc ggcaccgacc ttgggtggat 1380  
cgctcgcgac ggccgcgttc aacgtcgggt ctgcactggg accggcgctc ggcgggttg 1440  
cgatcggcat gggctctgagc taccgcgcc cgctctggac gagcgccgc ctggtgacac 1500  
tcgcgatcgt catcggcgca gccacctgt ctctgtggcg gcgaccagc tctgtccacg 1560

aatctgtccc cgcctgacca gaaaccagga tctgtgagtg tgggtgactga tctgtgcacg 1620  
ctcagcagtc accgcgcgct cgcgtcgtac cgagggccag cgccaacagg tgtgtggagc 1680  
tctgcccctg cctctttcac gcgaactcac tgttcagtgc ggcgatacgt gctcggtag 1740  
ttccactaca gcgaggtacc gagctcgtca ggtggcactt ttcggggaaa tgtgcgcgga 1800  
accctatatt gtttattttt ctaaatacat tcaaatatgt atccgctcat gagacaataa 1860  
ccctgataaa tgcttcaata atattgaaaa aggaagagta tgagtattca acatttcctg 1920  
gtcgccctta ttcccttttt tgcggcattt tgccttcctg tttttgctca cccagaaacg 1980  
ctggtgaaag taaaagatgc tgaagatcag ttgggtgcac gagtgggtta catcgaactg 2040  
gatctcaaca gcggtgaagat ccttgagagt ttcgccccg aagaacgttt tccaatgatg 2100  
agcactttta aagttctgct atgtggcgcg gtattatccc gtattgacgc cgggcaagag 2160  
caactcggtc gccgcataca ctattctcag aatgacttgg ttgagtactc accagtcaca 2220  
gaaaagcatc ttacggatgg catgacagta agagaattat gcagtgtctgc cataaccatg 2280  
agtgataaca ctgcggccaa cttacttctg acaacgatcg gaggaccgaa ggagctaacc 2340  
gcttttttgc acaacatggg ggatcatgta actcgccttg atcgttggga accggagctg 2400  
aatgaagcca taccaaacga cgagcgtgac accacgatgc ctgtagcaat ggcaacaacg 2460  
ttgcgcaaac tattaactgg cgaactactt actctagctt cccggcaaca attaatagac 2520  
tggtatggagg cggataaagt tgcaggacca cttctgcgct cggcccttcc ggctggctgg 2580  
tttattgctg ataaatctgg agccggtgag cgtgggtctc gcggtatcat tgcagcactg 2640  
gggccagatg gtaagccctc ccgtatcgta gttatctaca cgacggggag tcaggcaact 2700  
atggatgaac gaaatagaca gatcgtgag ataggtgcct cactgattaa gcattggtaa 2760  
ctgtcagacc aagtttactc atatatactt tagattgatt taaaacttca tttttaattt 2820  
aaaaggatct aggtgaagat cttttttgat aatctcatga ccaaaatccc ttaacgtgag 2880  
ttttcgttcc actgagcgtc agaccccgta gaaaagatca aaggatcttc ttgagatcct 2940  
ttttttctgc gcgtaatctg ctgcttgcaa acaaaaaaac caccgctacc agcgggtggtt 3000  
tgtttgccgg atcaagagct accaactctt tttccgaagg taactggctt cagcagagcg 3060  
cagataccaa atactgttct tctagtgtag ccgtagttag gccaccactt caagaactct 3120  
gtagcaccgc ctacatacct cgctctgcta atcctgttac cagtggctgc tgccagtggc 3180  
gataagtcgt gtcttaccgg gttggactca agacgatagt taccggataa ggcgagcg 3240  
tcgggctgaa cgggggggtc gtgcacacag cccagcttgg agcgaacgac ctacaccgaa 3300  
ctgagatacc tacagcgtga gctatgagaa agcgccacgc ttcccgaagg gagaaaggcg 3360

gacaggtatc cggtaagcgg cagggtcggg acaggagagc gcacgaggga gcttccaggg 3420  
ggaaacgcct ggtatcttta tagtcctgtc gggtttcgcc acctctgact tgagcgtcga 3480  
tttttgtgat gctcgtcagg ggggcggagc ctatggaaaa acgccagcaa cgcggccttt 3540  
ttacggttcc tggccttttg ctggcctttt gctcacatgt tctttcctgc gttatcccct 3600  
gattctgtgg ataaccgtat taccgccttt gagtgagctg ataccgctcg ccgcagccga 3660  
acgaccgagc gcagcgagtc agtgagcgag gaagcgggaag agcgcccaat acgcaaaccg 3720  
cctctccccg cgcgttggcc gattcattaa tgcagctggc acgactagag tcccgtgag 3780  
gcggcgtagc aggtcagccg cccagcgggt ggtcaccaac cgggggtggaa cggcgccgggt 3840  
atcgggtgtg tccgtggcgc tcattccaac ctccgtgtgt ttgtgcaggt ttcgcgtgtt 3900  
gcagtccctc gcaccggcac ccgcagcgag gggctcacgg gtgccgggtg gtcgactagt 3960  
tcagtgatgg tgatggtgat gctcgagaga tctaagcttg gatccgcggc cgctacgtag 4020  
aattcccata tggatgatgg gatggtggcc catggtatat ctcttctta aagttaaaca 4080  
aaattatttc tagacgccgt ccattatacc tcctcacgtg acgtgaggtg caagcccggg 4140  
cgttccgcgt gccacgccgt gagccgccgc gtgccgtcgg ctccctcagc ccgggcggcc 4200  
gtgggagccc gcctcgatat gtacaagcat ggggactcgc cgcggactag cggcttcccg 4260  
acacgccgta ctgaccagca gatcagcgat aaacgctgtt tctgctgggt aagtggataa 4320  
aaaccaaata atcgatgaac ctcgaaagtg agtatccgag ctgaactagc tggatttact 4380  
ccgaaaatac gagcggcgac gaagggtgtt ggaccaccct gccgccgcct tcgaggctcc 4440  
tacttgacta ggaccccgct cgttatgacc agcgtaagtg ctgaacacct ttccggcaaa 4500  
gaccggcccc ctgtcctcgt gtcgtccgat aagcgcggca tccggcacga acttcgaccc 4560  
aaacttcaac aaatcaccac gtcagaaact tttaatgcgt gcggccggcc gatttccggc 4620  
gtgaacgggtg tgaccatcgt caacgggtccc aaaggttccg gatttggagg ccttcgctcc 4680  
tgcggaaagg gctggatctg cccctgctgt gcgggaaaag tcggcgcaca tcgagcagac 4740  
gaaatttctc aagttgttgc tcatcaactc gggactggat ctgttgcgat ggtgaccatg 4800  
accatgcgc ataccgctgg gcagcgtttg catgatttgt ggactggact ttcggcagcc 4860  
tggaagctg cgaccaatgg ccgccgatgg cgtaccgaac gtgaaatgta cggctgcgac 4920  
ggatacgtac gagctgttga aatcactcac ggaaaaaacg gttggcacgt tcacgtccac 4980  
gctctactca tgttcagcgg tgacgtgagt gagaacatcc tcgaatcctt ctccgatgcg 5040  
atgttcgac ggtggacctc caaactcgtg tctctgggat ttgctgcgcc actacgtaat 5100  
tcagggtggac tcgacgtaag aaagattggt ggagaagctg accaagttct cgctgcatac 5160

ctgacgaaaa ttgcatccgg ggtcggcatg gaagtccgca gtggcgacgg aaaaagtgg 5220  
 cggcacggca accgtgcacc ttgggaaatc gccgttgatg cagtcggagg agatccacaa 5280  
 gcgttgaac tctggcgcgga gtttgagtgc ggttcgatgg gacgccgagc aatcgcatgg 5340  
 tctcgtggac tgcgcgccc agctggtctt ggcgtagaac tcacggatgc tcagattgtc 5400  
 gaacaggaag aatctgcccc ggtcatgggt gcgatcattc cggctcggtc ctggatgatg 5460  
 attcggaaact gtgcgcctta cgttttcgga gagatccttg gactcgtgga agcgggcgcg 5520  
 acctgggaaa accttcgtga ccacttgcat tatcgattgc ctgcagcgga tgtgcggcct 5580  
 ccgataatat cgattcgtaa gtgaaatgtc ttggtgtgca acaactttca ctcgatgaa 5640  
 ccacacttga gggcatcccc ccgatacttg ccgctttgaa gctgggtgtc tctctgtcag 5700  
 ggctgcgata gcaccgcgta gcggccttggc cttgacagag agacggcctg tttcatgggt 5760  
 ggtctcgggg ggctgaccgg gcagatagaa aaaggccggc cgatttggct gccgactatt 5820  
 tttgcaggta aaccatctc atgagcatca atgaacgtcc cgttggtatc gcagcgaatg 5880  
 cagcttcggg agacgtcgat ggcgttgtga tgggtgtgta tctctcgctt tatgggcaag 5940  
 aaatcacgct agatcgagat gatgcgttcc tactcctcga tcgacttcag gacgcgttgc 6000  
 gacctcaagc caactaagaa ccctccagat ggtctaaacg aggcgcaaac tcgctcctgg 6060  
 gcctgcgggc ggagcaccga agcgcgagcg aagcggagcg cgtaggtggg ggagcctgcg 6120  
 ggcagcggcg gcggagccgc cgccttggta ataggtgatc atcggggcca tagcaggtca 6180  
 gaggatgttt ttacgatgac tcatgctcac cagccaagt actgatg 6227

<210> 106

<211> 6231

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: vector pNit-RC2

<400> 106

gttaatgcat ccgaaacctc caccacctc acctagtccg acatccgtac cttggaaacc 60  
 gacctgtatt ggcatttcag ttggacatcg accagtggcg ttgctagggt caagaccatg 120

tccagcccga aggcgtccag actctagcca ccggaggtag tccggtggcc acatcccgtc 180  
gcgcccgaac gtcacgtctt tgtgtggcct tcccttggtg ttgcgatca gtggcacacc 240  
tctaccgtct gaatttcgag tctggcctcg gctgcgcaca tctcgactg tgacgtgtc 300  
aggtcacccg cttcgcggt accagttcct ttcacgaat cgagcttcg gtgcccgcgc 360  
gcagcctccc tgaccatcct cagattttat ggagtctcg agtgcctttc gctatctacg 420  
tcctcgggct tgctgtcttc gccaggga catccaggt catgttgtcc ggactcatac 480  
cggacatggc ccgtgacctc ggggtttcgg tccccgcgc cggactcctc acctccgcct 540  
tcgcggtcgg gatgatcatc ggcgtccgt tgatggctat cgcagcatg cgggtggccc 600  
ggcgacgcgc cttctgaca ttctcatca cgttcagt ggtccacgtc atcggcgcgc 660  
tcaccagcag cttcgaggtc ttgctggtc cagcatcgt gggagccctc gccaatgccg 720  
gattcttggc agtggccctg gggcggcga tggcgatggt gcccgccgac atgaaagggc 780  
gcgccacgtc cgtcctctc ggcggtgtc cgatcgcatg ttagccggt gttcccggg 840  
gcgccttcct gggtgaaatg tggggtggc gtgcagcgtt ctgggctgtc gtcgtcatct 900  
ccgcccctgc agtgggtggc attatgttcg ccacccggc cgagccgctt gcagagtcca 960  
caccgaatgc caagcgtgaa ctgtctcac tgcgtcacg caagctccag ctcatgcttg 1020  
tcctcggggc gctgatcaac ggcgcaacgt tctgttcgtt cacgtacatg gcgccacgc 1080  
tcaccgacat ctccggtttc gactccggtt ggattccgtt gctgctgggg ctgttcgggc 1140  
tcggatcgtt catcgggtgc agcgtcggag gcaggctcgc cgacaccgg ccgttccaac 1200  
tgctcgctgt cgggtccgca gcactgttga cgggatggat cgtcttcgt ctacggcat 1260  
ccaccccg cgtgacattg gtgatgctgt tcgtgcagg cgctttgtcc ttcgcggtcg 1320  
gctcgacttt gatctcccag gtgctctac ccgccgacgc ggcaccgacc ttgggtggat 1380  
cgttcgcgac ggccgcgttc aacgtcgggt ctgcactgg accggcgctc ggccgggttg 1440  
cgatcggcat ggggtctgag taccgcgcc cgctctggac gagcgccgc ctggtgacac 1500  
tcgcgatcgt catcggcgca gccacctgt ctctgtggc gcgaccagc tctgtccacg 1560  
aatctgtccc cgcctgacca gaaaccagga tctgtgagt tgggtgactga tctgtgcacg 1620  
ctcagcagtc accgcgcgt cgcgtcgtac cgagggccag cgccaacagg tgtgtggagc 1680  
tctgcccctg cctctttcac gcgaactcac tgttcagtgc ggcgatacgt gctcgggtgag 1740  
ttccactaca gcgaggatc gagctcgtc ggtggcactt ttcggggaaa tgtgcgcgga 1800  
acccctatct gtttatcttt ctaaatacat tcaaataatg atccgctcat gagacaataa 1860  
ccctgataaa tgcttcaata atattgaaaa aggaagagta tgagtattca acatttcgt 1920



gtcgccctta ttcccttttt tgcggcattt tgccttcctg tttttgctca cccagaaacg 1980  
ctggtgaaag taaaagatgc tgaagatcag ttgggtgcac gagtgggtta catcgaactg 2040  
gatctcaaca gcggtaatgat ccttgagagt tttcgccccg aagaacgttt tccaatgatg 2100  
agcactttta aagttctgct atgtggcgcg gtattatccc gtattgacgc cgggcaagag 2160  
caactcggtc gccgcataca ctattctcag aatgacttgg ttgagtactc accagtcaca 2220  
gaaaagcatc ttacggatgg catgacagta agagaattat gcagtgtgc cataaccatg 2280  
agtgataaca ctgcggccaa cttacttctg acaacgatcg gaggaccgaa ggagctaacc 2340  
gcttttttgc acaacatggg ggatcatgta actcgccttg atcgttggga accggagctg 2400  
aatgaagcca taccaaacga cgagcgtgac accacgatgc ctgtagcaat ggcaacaacg 2460  
ttgcgcaaac tattaactgg cgaactactt actctagctt cccggcaaca attaatagac 2520  
tggatggagg cggataaagt tgcaggacca cttctgcgct cggcccttcc ggctggctgg 2580  
tttattgctg ataaatctgg agccggtgag cgtgggtctc gcggtatcat tgcagcactg 2640  
gggccagatg gtaagccctc ccgtatcgta gttatctaca cgacggggag tcaggcaact 2700  
atggatgaac gaaatagaca gatcgtgag ataggtgcct cactgattaa gcattggtaa 2760  
ctgtcagacc aagtttactc atatatactt tagattgatt taaaacttca tttttaattt 2820  
aaaaggatct aggtgaagat cctttttgat aatctcatga ccaaaatccc ttaacgtgag 2880  
ttttcgttcc actgagcgtc agaccccgta gaaaagatca aaggatcttc ttgagatcct 2940  
ttttttctgc gcgtaatctg ctgcttgcaa acaaaaaaac caccgctacc agcgggtggtt 3000  
tgtttgccgg atcaagagct accaactctt tttccgaagg taactggctt cagcagagcg 3060  
cagataccaa atactgttct tctagtgtag ccgtagttag gccaccactt caagaactct 3120  
gtagcaccgc ctacatacct cgctctgcta atcctgttac cagtggctgc tgccagtggc 3180  
gataagtcgt gtcttaccgg gttggactca agacgatagt taccggataa ggcgagcgg 3240  
tcgggctgaa cgggggggtc gtgcacacag cccagcttgg agcgaacgac ctacaccgaa 3300  
ctgagatacc tacagcgtga gctatgagaa agcgccacgc ttcccgaagg gagaaaggcg 3360  
gacaggtatc cggtaagcgg cagggtcgga acaggagagc gcacgaggga gcttccaggg 3420  
ggaaacgcct ggtatcttta tagtctctgc gggtttcgac acctctgact tgagcgtcga 3480  
tttttgatg gctcgtcagg ggggcggagc ctatggaaaa acgccagcaa cgcggccttt 3540  
ttacggttcc tggccttttg ctggcctttt gctcacatgt tctttcctgc gttatccct 3600  
gattctgtgg ataaccgtat taccgccttt gactgagctg ataccgctcg ccgcagccga 3660  
acgaccgagc gcagcgagtc agtgagcgag gaagcggaag agcgccaat acgcaaaccg 3720

cctctccccg cgcgttggcc gattcattaa tgcagctggc acgactagag tcccgcgtgag 3780  
gcggcgtagc aggtcagccg cccagcgggt ggtcaccaac cgggggtggaa cggcgccgggt 3840  
atcgggtgtg tccgtggcgc tcattccaac ctccgtgtgt ttgtgcaggt ttcgcgtgtt 3900  
gcagtccctc gcaccggcac ccgcagcgag gggctcacgg gtgccgggtg gtcgactagt 3960  
tcagtgatgg tgatggtgat gctcgagaga tctaagcttg gatccgcggc cgctacgtag 4020  
aattcccatg gcgtgatggg gatggtgatg gcccatatgt atatctcctt cttaaagtta 4080  
aacaaaatta tttctagacg ccgtccatta tacctcctca cgtgacgtga ggtgcaagcc 4140  
cggacgttcc gcgtgccacg ccgtgagccg ccgcgtgccg tcggctccct cagcccgggc 4200  
ggccgtggga gccgcctcg atatgtacaa gcatggggac tcgccgcgga ctagcggctt 4260  
cccgacacgc cgtactgacc agcagatcag cgataaacgc tgtttctgct ggtaagtgg 4320  
ataaaaacca aataatcgat gaacctcgaa gtggagtatc cgagctgaac tagctggatt 4380  
tactccgaaa atacgagcgg cgacgaaggg tgttggaaca ccctgccgcc gccttcgagg 4440  
ctcctacttg actaggaccc cgctcgttat gaccagcgta agtgctgaac acctttccgg 4500  
caaagaccgg cccctgtcc tcgtgtcgtc cgataagcgc ggcatccggc acgaacttcg 4560  
acccaaactt caacaaatca ccacgtcaga aacttttaat gcgtgcggcc ggccgatttc 4620  
cggcgtgaac ggtgtgacca tcgtcaacgg tcccaaaggt tccggatttg gaggccttcg 4680  
ctcctgcgga aagggtgga tctgcccctg ctgtgcggga aaagtcggcg cacatcgagc 4740  
agacgaaatt tctcaagttg ttgctcatca actcgggact ggatctgttg cgatggtgac 4800  
catgaccatg cgccataccg ctgggcagcg tttgcatgat ttgtggactg gactttcggc 4860  
agcctggaaa gctgcgacca atggccgccg atggcgtaac gaacgtgaaa tgtacggctg 4920  
cgacggatac gtacgagctg ttgaaatcac tcacggaaaa aacggttggc acgttcacgt 4980  
ccacgtctta ctcatgttca gcggtgacgt gagtgagaac atcctcgaat cttctcggga 5040  
tgcgatgttc gatcgggtgga cctccaaact cgtgtctctg ggatttgctg cgccactacg 5100  
taattcaggt ggactcgacg taagaaagat tgggtggagaa gctgaccaag ttctcgctgc 5160  
atacctgacg aaaattgcat cgggggtcgg catggaagtc ggcatggcg acggaaaaag 5220  
tggtcggcac ggcaaccgtg caccttggga aatcgccgtt gatgcagtcg gaggagatcc 5280  
acaagcgttg gaactctggc gcgagtttga gttcggttcg atgggacgcc gagcaatcgc 5340  
atggtctcgt ggactgcgcg cccgagctgg tcttggcgta gaactcacgg atgctcagat 5400  
tgtcgâacag gaagaatctg ccccggtcat ggttgcgac attccggctc ggtcctggat 5460  
gatgattcgg aactgtgcgc cttacgtttt cggagagatc cttggactcg tggaagcggg 5520

cgcgacctgg gaaaaccttc gtgaccactt gcattatcga ttgcctgcag cggatgtgcg 5580  
 gcctccgata atatcgattc gtaagtgaat tgtcttggtg tgcaacaact ttcactcgta 5640  
 tgaaccacac ttgagggcac ccccccgata cttgccgctt tgaagctggg tgtctctctg 5700  
 tcagggtctgc gatagcaccg cgtagcggct tggccttgac agagagacgg cctgtttcat 5760  
 ggttggtctc ggggggctga ccgggcagat agaaaaaggc cggccgattt ggctgccgac 5820  
 tatttttgca ggtaaaccac tctcatgagc atcaatgaac gtcccgttgg tatcgacgag 5880  
 aatgcagctt cggtagacgt cgatggcggt gtgatgggtg tgtatctctc gctttatggg 5940  
 caagaaatca cgctagatcg agatgatgcg ttcctactcc tcgatcgact tcaggacgag 6000  
 ttgcgacctc aagccaacta agaaccctcc agatggtcta aacgaggcgc aaactcgctc 6060  
 ctgggcctgc gggcggagca ccgaagcgcg agcgaagcgg agcgcgtagg tgggggagcc 6120  
 tgcgggcagc ggcgggcggag ccgccgcctt ggtaataggt gatcatcggg gccatagcag 6180  
 gtcagaggat gtttttacga tgactcatgc tcaccacgcc aagtactgat g 6231

<210> 107

<211> 124

<212> DNA

<213> *Rhodococcus erythropolis*

<220>

<223> mutated TipA gene promoter

<400> 107

cgccccgggt gagggagccg acggcacgcg gcggctcacg gcgtggcacg cggaacgtcc 60  
 gggcttgac ctcacgtcac gtgaggaggt ataatggacg gcgtcagaga aggggacggc 120  
 catg 124

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/005585

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C12P21/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C12P21/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DIALOG), MEDLINE (STN), JSTPlus/JST7580 (JOIS), SwissProt/PIR/  
GeneSeq, GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Holmes D.J., et al., Autogenous transcriptional activation of a thiostrepton-induced gene in <i>Streptomyces lividans</i> , EMBO J., 1993, Vol.12, No.8, pages 3183 to 3191	1-9
A	Fenton M.S., et al., Function of the bacterial TATAAT-10 element as single-stranded DNA during RNA polymerase isomerization, Proc.Natl.Acad. Sci.USA., 2001, Vol.98, No.16, pages 9020 to 9025	1-9
A	Desomer J. et al., The plasmid-encoded chloramphenicol-resistance protein of <i>Rhodococcus fascians</i> is homologous to the transmembrane tetracycline efflux proteins, Molecular Microbiology, 1992, Vol.6, No.16, pages 2377 to 2385	5-9

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
18 May, 2004 (18.05.04)Date of mailing of the international search report  
08 June, 2004 (08.06.04)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/005585

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	De Mot. R. et al., Structural analysis of the 6 kb cryptic plasmid pFAJ2600 from <i>Rhodococcus erythropolis</i> NI86/21 and construction of <i>Escherichia coli</i> - <i>Rhodococcus</i> shuttle vectors, <i>Microbiology</i> , 1997, Vol.143, pages 3137 to 1347	5-9
P, A	WO 2004/016792 A1 (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 26 February, 2004 (26.02.04), & JP 2004-73032 A	1-9

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. C17 C12N15/09, C12P21/02

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. C17 C12N15/09, C12P21/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS/WPI (DIALOG), MEDLINE (STN), JSTPlus/JST7580 (JOIS), SwissProt/PIR/GeneSeq, GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Holmes D. J. et al., Autogenous transcriptional activation of a thiostrepton-induced gene in Streptomyces lividans, EMBO J, 1993, Vol. 12, No. 8, pp. 3183-3191	1-9
A	Fenton M. S. et al., Function of the bacterial TATAAT -10 element as single-stranded DNA during RNA polymerase isomerization, Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, Vol. 98, No. 16, pp. 9020-9025	1-9

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

18. 05. 2004

国際調査報告の発送日

08. 6. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

七條 里美

4B

2936

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Desomer J. et al., The plasmid-encoded chloramphenicol-resistance protein of <i>Rhodococcus fascians</i> is homologous to the transmembrane tetracycline efflux proteins, <i>Molecular Microbiology</i> , 1992, Vol.6, No.16, pp.2377-2385	5-9
A	De Mot R. et al., Structural analysis of the 6 kb cryptic plasmid pFAJ2600 from <i>Rhodococcus erythropolis</i> NI86/21 and construction of <i>Escherichia coli</i> - <i>Rhodococcus</i> shuttle vectors, <i>Microbiology</i> , 1997, Vol.143, pp.3137-3147	5-9
P, A	WO 2004/016792 A1 (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology) 2004.02.26 & JP 2004-73032 A	1-9